

Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovatelů. Převzaté údaje je vypůjčovatel povinen řádně ocitovat.

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Mikrobiologie



Bc. Václava Jarošová

Úloha proteinu Spr1851 *Streptococcus pneumoniae* v buněčném dělení
The role of Spr1851 protein *Streptococcus pneumoniae* in cell division

Diplomová práce

Vedoucí práce: RNDr. Aleš Ulrych, Ph.D.

Praha, 2017

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 14. 8. 2017

Podpis

Poděkování:

Touto cestou bych ráda poděkovala svému školiteli RNDr. Aleši Ulrychovi, Ph.D. nejen za vedení mé práce a cenné rady v průběhu jejího zpracovávání, ale i za jeho trpělivost a podporu. Mé poděkování dále patří RNDr. Pavlu Brannymu, CSc. za to, že mi umožnil zpracovávat diplomovou práci v jeho laboratoři. Neméně velký dík si zasouží i celý kolektiv Laboratoře buněčné signalizace – Karolína, Linda, Denisa, Andrea, Oliva, Silvie, Terka a Hanka za jejich ochotu, dobré rady a také za příjemné pracovní prostředí.

Úloha proteinu Spr1851 *Streptococcus pneumoniae* v buněčném dělení

S. pneumoniae, lidský extracelulární patogen, kóduje ve svém genomu unikátní serin/threoninovou kinázu eukaryotického typu StkP a k ní příslušnou fosfatázu PhpP. Tato kináza prostřednictvím fosforylace svých substrátů ovlivňuje řadu buněčných procesů, mezi které patří virulence, kompetence, buněčné dělení a syntéza buněčné stěny.

Hypotetický protein Spr1851, později pojmenovaný Jag, byl identifikován jako nový substrát kinázy StkP v membránové frakci porovnáním fosfoproteomů divokého kmene a kmene s delecí pro StkP. Tento protein se skládá ze třech domén a interdoménové oblasti, která obsahuje místo fosforylace T89. Na N-konci se nachází Jag_N doména s neznámou funkcí. C-konec obsahuje domény dvě – KH a R3H, které jsou vysoce konzervované a jejich předpokládanou funkcí je vazba nukleových kyselin.

Hlavním záměrem této práce bylo přiblížit funkci proteinu Jag, zjistit vliv jednotlivých domén na fenotyp a lokalizaci proteinu a určit roli fosforylace na T89. Získané výsledky potvrzují, že by protein Jag mohl hrát roli v buněčném dělení či syntéze buněčné stěny. Dále výsledky naznačují, že Jag_N doména je zásadní pro lokalizaci proteinu do membrány, zatímco za zmenšení buněk a růst, který je pozorovaný u delečního kmene, jsou zodpovědné KH a R3H doména, přičemž větší efekt má KH doména. Bylo také potvrzeno, že role fosforylace na T89 nemá vliv na fenotyp.

Klíčová slova: *S. pneumoniae*, buněčné dělení, StkP, Jag, fosforylace

The role of Spr1851 protein *Streptococcus pneumoniae* in cell division

Human extracellular pathogen *S. pneumoniae* encodes unique serin/threonine protein kinase of Eucaryotic type StkP and its cognate phosphatase PhpP. This kinase affects number of cellular processes including virulence, competence, cell division and cell wall synthesis by phosphorylating its substrates.

Hypothetical protein Spr1851 named Jag was identified as a new StkP substrate in the membrane fraction by comparing the wild-type phosphoproteomes with StkP deleted strain. This protein consists of three domains and an interdomain region that contains T89 phosphorylation site. There is a Jag_N domain with an unknown function at the N-terminus. The C-terminus contains two domains - KH and R3H, which are highly conserved and their expected function is binding of nucleic acid.

The main aim of this work is to explain the function of Jag protein, to determine the effect of individual domains on the phenotype and the localization of the protein and to determine the role of phosphorylation on T89. The results confirm that Jag protein could play a role in cell division or cell wall synthesis. Furthermore, the results indicate that the Jag_N domain is essential for the localization of the protein into the membrane, whereas the KH and R3H domains are responsible for the cell shortening and growth observed in the deletion strain, but it seems, that KH domain has a greater effect. It has also been confirmed that the role of phosphorylation on T89 does not affect the phenotype.

Keywords: *S. pneumoniae*, cell division, StkP, Jag, phosphorylation

Obsah

1	Úvod	8
2	Cíle diplomové práce	10
3	Literární rešerše	11
3.1	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	11
3.2	Buněčné dělení <i>S. pneumoniae</i>	14
3.3	Kináza StkP	23
3.3.1	Funkce	24
3.3.2	Substráty StkP	25
4	Materiál a metody	29
4.1	Materiál	29
4.1.1	Chemikálie	29
4.1.2	Bakteriální kmeny a vektory	32
4.1.3	Kultivační půdy a použitá antibiotika	34
4.1.4	Oligonukleotidy	35
4.1.5	Enzymy	37
4.1.6	Protilátky	37
4.1.7	Roztoky, pufrý a standardy	37
4.1.8	Komerční soupravy a membrány	39
4.1.9	Laboratorní přístroje, počítačová analýza, software	40
4.2	Metody	41
4.2.1	Manipulace s DNA	41
4.2.2	Manipulace s proteiny	44
4.2.3	Manipulace s buňkami <i>S. pneumoniae</i>	46
4.2.4	Manipulace s buňkami <i>E. coli</i>	48
4.2.5	Mikroskopie	48
5	Výsledky	50
5.1	Příprava mutantních kmenů <i>S. pneumoniae</i>	50
5.1.1	Příprava kmenů exprimujících zkrácené formy proteinu Jag	50
5.1.2	Kmeny vytvořené pro stanovení lokalizace proteinu Jag v buňce	52
5.1.3	Příprava kmenů určených pro stanovení lokalizace známých proteinů buněčného dělení na pozadí Δ jag kmene	55
5.1.4	Kmen exprimující Jag-Flag v nativním lokusu (Sp319)	56
5.1.5	Příprava kmene se záměnou T89 za kyselinu asparagovou (Sp322)	57

5.1.6	Příprava komplementačního kmene (Sp324) a kmene se záměnou T89 za kyselinu glutamovou (Sp325).....	58
5.2	Charakterizace fenotypu jag mutantních kmenů	61
5.2.1	Ověření exprese a fosforylace zkrácených forem	61
5.2.2	Morfologická a růstová charakterizace mutantních kmenů nesoucích zkrácené formy proteinu Jag	63
5.2.3	Asociace zkrácených forem s membránou	67
5.2.4	Lokalizace proteinu Jag a jeho zkrácených forem v buňce	69
5.3	Vliv proteinu Jag na syntézu buněčné stěny a na lokalizaci vybraných proteinů buněčného dělení	76
5.3.1	Vliv proteinu Jag na syntézu buněčné stěny	76
5.3.2	Vliv proteinu Jag na lokalizaci vybraných proteinů buněčného dělení	77
5.4	Stanovení role fosforylace na T89	79
5.4.1	Ověření exprese a fosforylace mutovaných proteinů pomocí imunodetekce	79
5.4.2	Stanovení morfologie a velikosti buněk fosfomimetických kmenů	80
6	DISKUZE	83
6.1	Charakterizace zkrácených forem	86
6.2	Vliv proteinu Jag na lokalizaci vybraných proteinů buněčného dělení a komplexů syntézy buněčné stěny	89
6.3	Stanovení role fosforylace na T89	90
7	SOUHRN	92
8	POUŽITÁ LITERATURA	93

Seznam zkratk

A	alanin
ABC	z anglického ATP binding cassette
Anti	protilátka
a.u.	arbitrární jednotka
CDD	Conserved Domain Database
CF	cytoplazmatická frakce proteinů
CSP	peptid stimulující kompetenci
D	kyselina asparagová
E	kyselina glutamová
ESTK	serin/threoninová proteinkináza eukaryotického typu
ESTP	serin/threoninová proteinfosfatáza eukaryotického typu
g	tíhové zrychlení
GFP	zelený fluorescenční protein
HE	hrubý proteinový extrakt
chDNA	chromozomální DNA
kb	kilobáze
kDa	kilodalton
MF	membránová frakce proteinů
OD ₆₀₀	optická denzita při vlnové délce 600 nm
PASTA	domény, které se vyskytují u penicilin vazebných proteinů a některých ESTK
PBP	penicilin vazebný protein
PCR	polymerázová řetězová reakce
PG	peptidoglykan
PVDF	polyvinylidenfluorid
T89	threonin v pozici 89
T89D	záměna threoninu v pozici 89 za kyselinu asparagovou
T89E	záměna threoninu v pozici 89 za kyselinu glutamovou
VAN-FL	fluorescenční značení vankomycinem
WT	divoký kmen

1 Úvod

Bakteriální buňky žijí ve velmi proměnlivém a heterogenním prostředí. Proto, aby jednotlivé buňky, kolonie a bakteriální populace přežily, je nezbytné jejich neustálé přizpůsobování měnícímu se prostředí. Je tedy velmi důležité, aby buňky byly schopné jednotlivé stimuly včas rozpoznat a dostatečně rychle na ně reagovat. To jim umožňují rozmanité signální dráhy, které zpracovávají signál jak z intracelulárního tak extracelulárního prostředí.

Hlavním mechanismem přenosu signálu jak u prokaryot, tak u eukaryot je vratný přenos fosfátové skupiny na fosforylovatelné aminokyselinové zbytky, který zprostředkovávají enzymy kinázy. Opačný proces, defosforylaci, zprostředkovávají enzymy fosfatázy. Od té doby, co bylo zjištěno, že genomy prokaryot neobsahují pouze proteiny fungující v dvoukomponentových systémech, ale i serin/threoninové kinázy a fosfatázy eukaryotického typu, jsou tyto enzymy hojně studovány. Bylo prokázáno, že se podílí na řadě důležitých buněčných procesů, jako je například buněčné dělení, syntéza buněčné stěny či tvorba biofilmu.

S. pneumoniae kóduje unikátní serin/threoninovou kinázu eukaryotického typu StkP a k ní příslušnou fosfatázu PhpP. StkP je membránově vázaný enzym, který je aktivován v růstové fázi a jako signál pro jeho aktivaci slouží podjednotky peptidoglykanu. Tato kináza je globálním regulátorem, ovlivňuje transkripci stovek genů a podílí se tak na regulaci virulence, kompetence, odolnosti ke stresům, určování tvaru buňky a řídí také proces buněčného dělení a syntézy buněčné stěny. Přestože má tato kináza široké pole účinku a reguluje zásadní buněčné procesy, bylo dosud identifikováno pouze deset jejích substrátů. Jedná se o proteiny buněčného dělení (FtsZ, FtsA, LocZ, DivIVA), syntézy buněčné stěny (GlmM, MurC), transkripční regulátor RitR, který ovlivňuje příjem železa, anorganickou pyrofosfatázu PpaC a transkripční regulátor RR06, který je součástí systému ovlivňujícího virulenci. Nejnověji identifikovaným substrátem StkP kinázy je hypotetický protein Spr1851, pojmenovaný Jag.

Ve struktuře proteinu Jag *S. pneumoniae*, homologního k Jag/SpoIIIJ asociovanému proteinu *B. subtilis*, jsou predikovány tři konzervované domény – N-koncová Jag_N doména

s neznámou funkcí a dvě C-koncové domény (KH a R3H), jejichž předpokládanou funkcí je vazba nukleových kyselin. Tento protein je fosforylován prostřednictvím StkP kinázy na threoninu v pozici 89 a na jednom dosud nepopsaném threoninovém zbytku. Odstranění proteinu Jag vede k tvorbě krátkých buněk, které jsou podobné buňkám tvořeným kmenem s odstraněnou PhpP fosfatázou. Předpokládaná funkce proteinu Jag je proto blíže neurčená role v buněčném dělení.

Tato práce se zabývá bližší charakterizací proteinu Jag a vlivem jednotlivých domén na lokalizaci proteinu a na fenotyp *S. pneumoniae*. Dále je v práci testován vztah mezi proteinem Jag a proteiny buněčného dělení a syntézy buněčné stěny. V neposlední řadě je zkoumán vliv fosforylace na threoninu v pozici 89 na buněčnou morfologii.

2 Cíle diplomové práce

Cílem této práce bylo studium proteinu Jag (Spr1851), stanovení funkce jeho jednotlivých domén a vlivu fosforylace na buněčnou morfologii. Dílčí cíle jsou uvedeny v následujících bodech:

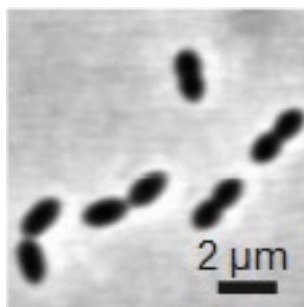
- Vytvořit kmeny exprimující zkrácené formy proteinu Jag a následně je charakterizovat růstově a morfologicky. Určit funkci jednotlivých domén.
- Vytvořit kmeny exprimující protein Jag a jeho zkrácené formy fúzované s GFP a zjistit lokalizaci těchto mutovaných proteinů.
- Určit, zda má protein Jag vliv na lokalizaci komplexů syntézy buněčné stěny či na lokalizaci časných a pozdních proteinů buněčného dělení.
- Připravit kmeny nesoucí fosfomimetické záměny T89 a charakterizovat je.

3 Literární rešerše

3.1 *Streptococcus pneumoniae*

Bakterie *S. pneumoniae* náležící do kmene *Firmicutes*, čeledi *Streptococcaceae* a rodu *Streptococcus* je grampozitivní potenciální patogen ovoidního tvaru, který se vyskytuje v podobě koků, diplokoků či krátkých řetízků složených z několika buněk (viz obrázek 1). Z hlediska tolerance k přítomnosti kyslíku bývá pneumokok řazen mezi fakultativní anaeroby. Bakterie je nepohyblivá a nesporulující. *S. pneumoniae* patří k alfa-hemolytickým bakteriím, které při kultivaci na krevním agaru způsobují přeměnu hemoglobinu na verdoglobín, což se projevuje tvorbou nazelenalé zóny v okolí streptokokových kolonií.

Obrázek 1: *S. pneumoniae*



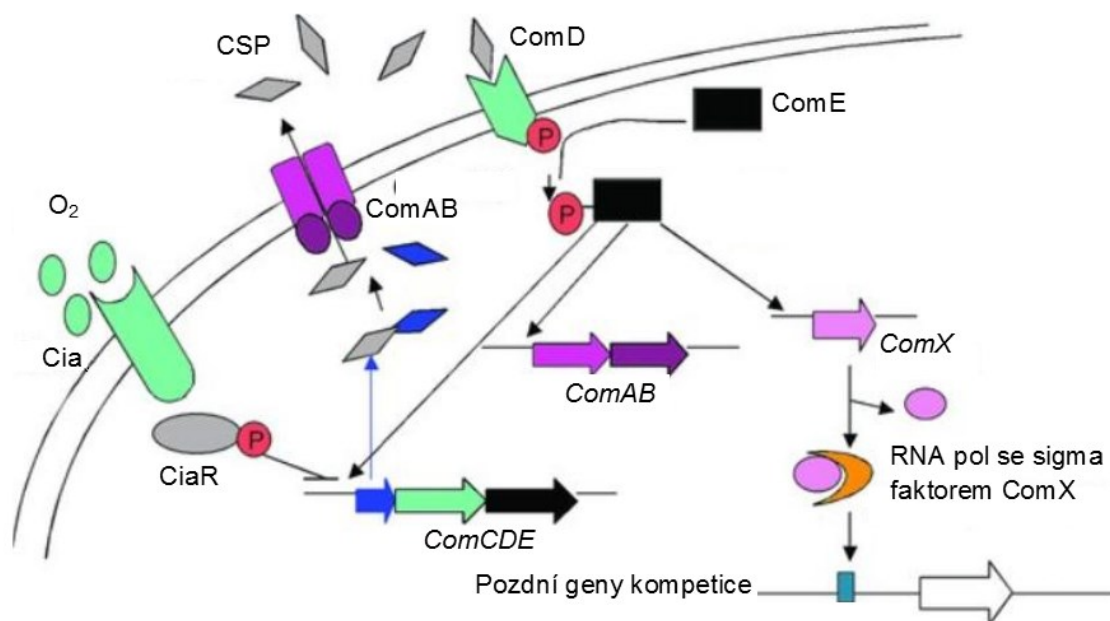
Mikroskopický snímek divokého kmene *S. pneumoniae* pořízený pomocí fázového kontrastu. Zdroj: Vlastní zpracování.

Bakterie *S. pneumoniae* byla dvakrát nezávisle izolována a popsána v druhé polovině devatenáctého století - Francouzem Louisem Pasteurem a Američanem Georgem Sternbergem. V roce 1928 byl pneumokok použit v experimentu Fredericka Griffitha (1928), který vedl k objevení transformačního principu. V tomto experimentu byl použit virulentní kmen (označený jako S) zabíjející myš a kmen nevirulentní (označený jako R). Infekce myši buňkami virulentního kmene měla letální následky, zatímco myši infikované nevirulentním kmenem přežily. Pokud k infekci došlo po přidání usmrcených buněk virulentního kmene k živým buňkám nevirulentním, stal se z nich kmen schopný usmrtit myš. Závěrem této práce bylo, že existuje určitá substance, která může být z mrtvých buněk přenesena do živých bakterií a měnit jejich vlastnosti. Tuto otázku o několik let později vyřešili Avery, McLeod a McCarty (1944), kteří prokázali, že za transformační princip je zodpovědná DNA. Vzhledem k tomu, že pneumokok způsobuje vážné zdravotní problémy, hlavním tématem řešeným v druhé polovině minulého století bylo zkoumání jeho citlivosti k antibiotikům

(D'Amato et al., 1987). Pneumokok je předmětem výzkumu i nadále, kdy jsou ve spojitosti s ním zkoumána témata, jako je například tvorba biofilmu (Yadav et al., 2015), či mechanismus buněčného dělení (Mura et al., 2017).

Pneumokok je také známý pro svoji schopnost navození stavu přirozené kompetence, při které dochází k přenosu DNA z okolního prostředí do buňky. Pokud je přijatá DNA dostatečně homologní, může dojít k jejímu následnému vložení do genomu v procesu nereciproční homologní rekombinace. Dochází tak ke sdílení genů výhodných pro bakteriální populaci, jako jsou geny pro rezistenci k antibiotikům či geny pro zpracovávání nových zdrojů uhlíku. Kompetence u bakterií bývá navozena pomocí mechanismu „*quorum sensing*“, při kterém dochází v závislosti na hustotě populace ke změně genové exprese. Tímto mechanismem je u různých druhů bakterií ovlivňována řada buněčných procesů jako například tvorba biofilmu (Davies et al., 1998), sporulace (Veening et al., 2005) či schopnost konjugace (Zhang et al., 1993). U pneumokoka dochází k navození stavu kompetence po dosažení prahové hodnoty signální molekuly CSP (Competence Stimulating Peptid). Geny zajišťující kompetenci jsou kódované *comABCDE* lokusem (Håvarstein et al., 1996). Nefunkční CSP vzniká expresí genu *comC* a je ven z buňky transportován pomocí ABC (ATP Binding Cassette) transportéru *comAB*, který zároveň funguje jako proteáza aktivující CSP sestřihem. Detekci tohoto peptidu v prostředí zajišťuje membránově vázaná receptorová histidinová kináza *ComD*, která fosforyluje transkripční regulátor *ComE*. Fosforylovaný *ComE* aktivuje expresi *comABCDE*, alternativního sigma faktoru X a proteinů *CbpD* a *ComM* (Peterson et al., 2004). Alternativní sigma faktor X slouží jako pozitivní regulátor exprese pozdních genů pro kompetici (Luo et al., 2003). Proteiny *CbpD* a *ComM* jsou klíčové při bratrovražedném procesu, ve kterém murein hydroláza *CbpD* lyzuje buňky, které nejsou ve stavu kompetence. Protein *ComM* funguje jako protein, který buňkám produkujícím *CbpD* zajišťuje imunitu (Håvarstein et al., 2006). Kompetence je negativně regulována pomocí dvoukomponentového *CiaRH* systému (Guenzi et al., 1994). Schopnost takto přijmout cizorodou DNA bývá u pneumokoka využívána při cílených genetických manipulacích. Mechanismus regulace shrnuje obrázek 2.

Obrázek 2: Mechanismus regulace kompetence u *S. pneumoniae*



Na obrázku je znázorněn mechanismus regulace kompetence u *S. pneumoniae*. Schéma zobrazuje regulaci Cia mechanismem a dráhou zahrnující CSP. Převzato a upraveno z Cvitkovitch et al. (2003).

S. pneumoniae je podmíněně patogenní bakterií, která běžně kolonizuje horní cesty dýchací a v neopouzdřené formě se zde vyskytuje jako běžná součást mikroflory. K významnosti pneumokoka jako patogena přispívá množství virulenčních faktorů, které u něj lze nalézt. Nejvýznamnějším z nich je polysacharidové pouzdro, které obklopuje celou dvojici diplokoků a umožňuje přechod mezi nepatogenní bakterií a bakterií způsobující onemocnění. Tento obal nejenže brání aktivaci buněčného komplementu a fagocytóze bakterie (Hyams et al., 2010), ale také usnadňuje kolonizaci horních cest dýchacích (Hammerschmidt et al., 2005). Podle typu pouzdra bylo popsáno více než 90 sérotypů, jejichž existence komplikuje vývoj účinných vakcín. Dalším významným virulenčním faktorem pneumokoka je enzym neuraminidáza, který štěpí konce sialové kyseliny z glykolipidů a glykoproteinů. Tato enzymová aktivita umožňuje šíření bakterie v infikované tkáni. Šíření bakterie do okolních tkání umožňuje i enzym hyaluronát lyáza, který rozkládá složku extracelulární matrix tkání, kyselinu hyaluronovou (Berry et al., 1994). Mezi významné proteiny narušující hostitelskou buňku řadíme i toxin pneumolysin, který tvoří póry v membráně, čímž narušuje osmotickou rovnováhu a způsobuje lyzi buněk hostitele, a autolysin, který rozrušuje komponenty bakteriální buněčné stěny a tím umožňuje uvolnění pneumolysinu z bakteriální buňky. Dále lze mimo jiné mezi faktory virulence zařadit i cholin

vazebný protein A, jehož funkcí je umožnění adheze ke tkáni během kolonizace (Rosenow et al., 1997) a povrchový protein A, který zabraňuje vazbě komplementu na bakterii (Ren et al., 2012).

Pneumokok způsobuje řadu zdravotních potíží, ať se jedná o ty s lehčím průběhem jako zánět nosních dutin či středního ucha, nebo o potíže závažnější, jako je zápal plic, zánět mozkových blan či sepse. Každý rok na potíže spojené s infekcí *S. pneumoniae* zemře více než 1,5 milionu lidí. Nejohroženější skupiny tvoří děti do dvou let věku, osoby starší 65 let a lidé se sníženou obranyschopností (WHO, 2013). Snaha vyvinout účinnou pneumokokovou vakcínu pro nejohroženější skupiny obyvatel a proti všem sérotypům je zatím neúspěšná. Vakcíny jsou založené na přítomnosti polysacharidů pouzdra nejběžnějších kmenů. Podle polysacharidů pouzdra lze pneumokoky rozdělit na více než 90 sérotypů, které mají různé geografické zastoupení, z čehož také vyplývá slabina této vakcíny, která obsahuje pouze několik polysacharidových antigenů a tudíž je účinná pouze proti omezenému množství sérotypů (Hausdorff et al., 2000). V posledních letech se proto objevují snahy vyvinout vakcíny založené na nových antigenech jako je například StkP konzervovaná napříč všemi sérotypy (Schmid et al., 2011), povrchový cholin-vazebný protein A (Ochs et al., 2016), či povrchový protein K (Jang et al., 2017).

Protože genom bakterie *S. pneumoniae* obsahuje pouze jednu serin/threoninovou proteinkinázu eukaryotického typu (ESTK - Ekaryotic-type Serine/Threonine protein Kinase) nazvanou StkP a jednu k ní příslušnou fosfatázu (ESTP - Ekaryotic-type Serine/Threonine protein Phosphatase) pojmenovanou PhpP, které kontrolují prostřednictvím fosforylace/defosforylace svých substrátů mimo jiné také buněčné dělení, představuje pneumokok vhodný modelový organismus pro studium těchto enzymů a jejich substrátů v regulaci buněčného dělení.

3.2 Buněčné dělení *S. pneumoniae*

U většiny bakterií buněčné dělení vede ke vzniku dvou morfologicky a geneticky shodných dceřiných buněk. Obecný model pro dělení bakteriálních buněk zahrnuje prodloužení mateřské buňky, replikaci DNA, oddělení jednotlivých kopií chromozomu, tvorbu septa a konečné oddělení buněk. Buněčné dělení prokaryot je nejvíce prozkoumáno u dvou modelových organismů - gramnegativní *E. coli* a grampozitivní bakterie *B. subtilis*.

Základním předpokladem pro buněčné dělení je správné oddělení replikovaného chromozomu. U modelové bakterie *B. subtilis* jsou v prvních krocích tohoto procesu zapojeny proteinové komplexy ParABS (Ireton et al., 1994; Murray a Errington, 2008) a SMC-ScpAB (Graumann et al., 1998). ParABS komplex se skládá ze dvou proteinů – z DNA vazebného proteinu ParB, který rozpoznává *parS* sekvenci v originu replikace a ParA, který má funkci ATPázy, která táhne nově replikované počátky od sebe. Systém SMC-ScpAB se skládá ze třech proteinových složek SMC, ScpA a ScpB. Přesná role tohoto komplexu zatím není známá, ale je uvažováno o tom, že je zásadní při organizaci a kondenzaci chromozomů (Mascarenhas et al., 2002). U *E. coli* dosud nebyl nalezen systém ParABS ani SMC-ScpAB. Došlo ale k objevení proteinového komplexu MukBEF, který se také řadí ke komplexům podobným kondenzinu (Danilova et al., 2007).

S. pneumoniae patří ke streptokokům oválného tvaru, u kterých není raná fáze segregace chromozomů dostatečně charakterizována. Pneumokok využívá systém SMC-ScpAB a Par systém obsahující pouze ParB protein. ParB rekrutuje SMC komplex do oblasti počátku replikace. Na rozdíl od *B. subtilis* u pneumokoka v laboratorních podmínkách nejsou ParBS či SMC-ScpAB esenciální (Minnen et al., 2011), což vedlo ke snaze identifikovat jiné systémy podílející se na segregaci chromozomů. Později bylo zjištěno, že pro správnou segregaci chromozomů je potřebný i proces transkripce ačkoliv mechanismus regulace zatím není znám. Ve stejné práci bylo prokázáno, že systém SCM se podílí nejen na segregaci chromozomů, ale že také brání tvorbě septa v oblasti nesegregovaných chromozomů (Kjos a Veening, 2014).

Pozdní kroky segregace chromozomů jsou mezi bakteriemi konzervovanější. U pneumokoka lze najít rekombinázu XerD a protein FtsK. Rekombináza XerD stimuluje rozštěpení chromozomálních dimerů (Chalker et al., 2000). Protein FtsK je translokáza, která umožňuje transport replikovaného chromozomu do dceřiné buňky a mimo jiné stimuluje rozštěpení chromozomálních dimerů (Liu et al., 1998).

Prvním krokem samotného buněčného dělení je výběr správného místa pro tvorbu přepážky. Toto místo je určeno tvorbou Z-kruhu, složeného z polymerů proteinu FtsZ, který se utváří ve středu buňky a slouží jako opora pro vazbu dalších proteinů buněčného dělení. U *E. coli* a *B. subtilis* je prostorová regulace tvorby Z-kruhu určena pomocí systému Min (De Boer et al., 1989) a systému chromozomální okluze (Minnen et al., 2011), které negativně

regulují jeho tvorbu. U některých bakterií je přítomen pouze jeden z těchto systémů, zatímco jiné postrádají homology pro oba systémy zároveň, což naznačuje, že existují i jiné mechanismy regulace správného umístění septa v buňce. Například u *Caulobacter crescentus* byl popsán protein MipZ, který inhibuje tvorbu Z-kruhu (Thanbichler a Shapiro, 2006). Byly však popsány i pozitivní regulátory určující místo vzniku Z-kruhu, které podporují polymeraci proteinu FtsZ. K proteinům s touto funkcí patří například protein SsgB u *Streptomyces coelicolor* (Willemse et al., 2011) či protein PomZ u bakterie *Myxococcus xanthus* (Treuner-Lange et al., 2013). Pneumokok se řadí k ovoidním bakteriím a dosud u něj nebyly identifikovány proteiny systémů popsaných u výše zmíněných modelových organismů, což vedlo ke snaze charakterizovat nové proteiny buněčného dělení. U pneumokoka byl objeven pozitivní regulátor tvorby septa, protein LocZ (Holečková et al., 2015), nazývaný také jako MapZ (Fleurie et al., 2014), který tvoří kruh ve středu buňky před vytvořením Z-kruhu a řídí sestavení komplexu složeného z proteinů buněčného dělení. Nejnovější výsledky naznačují, že tento protein hraje důležitou roli zejména při určování správné dělicí roviny (Raaphorst et al., 2017).

Jedním z hlavních proteinů buněčného dělení je již zmíněný vysoce konzervovaný cytoskeletální protein FtsZ. Jedná se o esenciální protein, který je prokaryotickým homologem tubulinu. FtsZ po vazbě GTP tvoří protofilamenta, váže se na membránu a uspořádává se do kruhové struktury umístěné ve středu buňky, která se nazývá Z-kruh (Bi a Lutkenhaus, 1991; De Boer et al., 1992; Busiek a Margolin, 2015). Tvorba Z-kruhu vyžaduje u *E. coli* přítomnost dalších dvou esenciálních proteinů – FtsA a ZipA, které váží FtsZ k membráně (Hale a De Boer, 1997; Pichoff a Lutkenhaus, 2005). Pokud v buňce není přítomný ani jeden z těchto dvou proteinů, Z-kruh se netvoří (Pichoff a Lutkenhaus, 2002). Pozitivní roli ve stabilizaci Z-kruhu hrají i proteiny ZapC a ZapD (Durand-Heredia et al., 2012). Protein ZipA bychom u zástupce grampozitivních bakterií *B. subtilis* nenašli, zato je u něj stabilita Z-kruhu kontrolována pomocí negativního regulátoru ErzA (Levin et al., 1999) a stabilizátoru SepF (Ishikawa et al., 2006).

Po ustavení Z-kruhu jsou další proteiny buněčného dělení postupně uspořádány ve středu buňky do multiproteinového komplexu zvaného divisom. Divisom je u *E. coli* tvořen mimo FtsA, ZipA a FtsZ ještě dalšími devíti proteiny. K těmto proteinům patří FtsE a FtsX, které slouží jako ABC transportér a plní důležitou úlohu ve skládání a stabilitě

Z-kruhu (Schmidt et al., 2004). Dále je sem řazen bifunkční protein FtsK, který kromě buněčného dělení hraje roli i v lokalizaci chromozomů (Liu et al., 1998), komplex proteinů FtsQ, FtsL, a FtsB pravděpodobně spojující divisom s komplexy proteinů syntézy buněčné stěny (Buddelmeijer a Beckwith, 2004). Další složku divisomu představují proteiny FtsI a FtsW, jenž se účastní syntézy peptidoglykanu (PG – peptidoglykan) (Mercer a Weiss, 2002). V neposlední řadě divisom tvoří i protein FtsN, který pravděpodobně přináší signál o tom, že divisom je kompletní a může začít tvorba buněčné stěny a následná konstrikce (Gerding et al., 2009). Seznam proteinů buněčného dělení *S. pneumoniae* je spolu s proteiny zajišťujícími syntézu PG uveden v tabulce na konci kapitoly (tabulka 1). Genom pneumokoka kóduje proteiny, které jsou homologní nejen k proteinům *E. coli* (např. DivIB, DivIC), ale i k proteinům *B. subtilis* (např. Jag, DivIVA) a dokonce i proteiny, pro které zatím nebyly nalezeny žádné homology (např. LocZ).

Syntéza buněčné stěny je dalším nezbytným krokem k rozdělení buňky. Buněčnou stěnu grampozitivních bakterií tvoří PG, teichoové a lipoteichoové kyseliny. PG je složen z polymerů N-acetylglukozaminu a N-acetylmuramové kyseliny, které jsou navzájem propojené pomocí β -1,4-glykosidických vazeb. Ke karboxylové skupině N-acetylmuramové kyseliny se váže tetrapeptid složený z následujících aminokyselin - L-alaninu, D-glutamové kyseliny, druhově závislé aminokyseliny a D-alaninu. Příčné propojení pomocí terminálního D-alaninu jednoho řetězce ke třetí aminokyselině tetrapeptidu druhého řetězce dává struktuře PG pevnost. Proteiny, které katalyzují syntézu PG a jeho modifikaci se nazývají penicilin vazebné proteiny (PBPs – Penicilin Binding Proteins). U koků je tvorba buněčné stěny zajišťována jen jedním komplexem proteinů lokalizovaným do středu buňky. U buněk tyčinkovitého tvaru se na syntéze PG podílejí dva proteinové komplexy – jeden zodpovědný za syntézu buněčné stěny v oblasti přepážky a druhý zprostředkovávající periferní syntézu PG, která má za následek elongaci buněk. Tyto dva komplexy však nekolokalizují. U pneumokoka jako u ostatních ovokoků také nalezneme dva komplexy, které v buňce kolokalizují v oblasti buněčné přepážky viz přehledový článek (Zapun et al., 2008).

Komplex periferní syntézy PG u pneumokoka je tvořen osmi proteiny MreC, MreD, RodA, PBP2b, PBP1a, GpsB, MltG a RodZ. Na rozdíl od tyčinkovitých bakterií genom *S. pneumoniae* nekóduje determinantu tyčinkovitého růstu MreB. Proteiny MreC a MreD jsou pro pneumokoka částečně esenciální v závislosti na genetickém pozadí (Land a Winkler,

2011). PBPs produkované *S. pneumoniae* můžeme rozdělit na tři třídy v závislosti na jejich molekulové hmotnosti, struktuře domén a enzymatické aktivitě. Třída A obsahuje bifunkční proteiny, které mají jak transpeptidázovou tak glykosyltransferázovou aktivitu (např. PBP1a, PBP1b, PBP2a). Do třídy B se řadí proteiny pouze s transpeptidázovou aktivitou, které mají N-koncovou doménu s neznámou funkcí, jako jsou PBP2x a PBP2b. Právě PBP2b funguje jako hlavní transpeptidáza periferní syntézy PG (Goffin a Ghuysen, 1998). Do třídy C patří proteiny s karboxypeptidázovou či endopeptidázovou aktivitu. Odpovídajícím proteinem je PBP3 (Severin et al., 1992). Dalším proteinem zodpovědným za periferní syntézu PG u *S. pneumoniae* je protein RodA. RodA patří do rodiny proteinů ovlivňující tvar buněk, jejich prodloužení, buněčné dělení a sporulaci a umožňuje polymeraci PG i v nepřítomnosti PBPs (Meeske et al., 2016). Protein GpsB je považován za hlavní regulátor syntézy PG u gram pozitivních bakterií s nízkým obsahem GC párů. GpsB interaguje přímo či nepřímo s PBPs. Na základě interakce s PBP2b je u *S. pneumoniae* inhibována periferní syntéza PG. Naopak interakcí s StkP a PBP2x je pozitivně regulováno uzavírání septa (Rued et al., 2017). Štěpící enzym MltG uvolňuje nově syntetizované glykanové řetězce při periferní syntéze PG (Tsui et al., 2016). Funkce proteinu RodZ není zatím zcela známá, ale je uvažováno o tom, že by mohl hrát roli v regulaci aktivity proteinů MltG a PBP1a (Tsui et al., 2016). Ani role ostatních proteinů komplexu není zatím objasněna. V loňském roce byl objeven protein CozE, který je pravděpodobně také součástí elongačního komplexu (Fenton et al., 2016).

Komplex septální syntézy PG je tvořen proteiny DivIB, DivIC, FtsL, FtsW, PBP2x, PBP1a, PBP2a a GpsB. Přesná funkce proteinů DivIB, DivIC a FtsL v septální syntéze PG není známa. Protein FtsW je transportérem peptidoglykanových prekurzorů z cytoplasmy do extracelulárního prostoru. Dva penicilin vazebné proteiny syntetizují nový PG v oblasti septa - PBP2x (Morlot et al., 2013) s transpeptidázovou aktivitou a bifunkční protein PBP2a, který má jak transpeptidázovou, tak i glykosyltransferázovou aktivitu (Tsui et al., 2016). Obě zmíněné aktivity vykonává i protein PBP1a, který se účastní jak septální, tak i periferní syntézy peptidoglykanu a transmembránový protein PBP1b, jehož přesná role v syntéze PG zatím zůstává neznámá (Lovering et al., 2006; Tsui et al., 2016).

K buněčnému dělení patří nejen syntéza PG, ale i jeho štěpení, které umožní oddělení dceřiných buněk. Za štěpení PG jsou zodpovědné enzymy hydrolázy. U pneumokoka je oddělení dceřiných buněk zprostředkováno pomocí LytB (De Las Rivas et al., 2002) a PcsB hydroláz (Sham et al., 2011).

Tabulka 1: Proteiny buněčného dělení a syntézy PG *S. pneumoniae*

	Protein	Esencialita	Funkce	Reference
Buněčné dělení	DivIVA	NE	Neznámá, vyžadován pro dokončení buněčného dělení a maturaci pólů	(Fadda et al., 2003) (Fadda et al., 2007)
	ErzA	E	Negativní regulátor Z-kruhu	Fadda a Massidda, nepublikováno
	FtsA	E	Strukturní homolog aktinu, vazba FtsZ k membráně, stabilizace Z-kruhu	(Lara et al., 2005)
	FtsE	E	ABC transportér	(Sham et al., 2011)
	FtsX	E	ABC transportér	(Sham et al., 2011)
	FtsZ	E	Strukturní homolog tubulinu, strukturní komponenta Z-kruhu	(Lara et al., 2005)
	Jag	NE	Neznámá	(Ulrych et al., 2016)
	LocZ	NE	Pozitivní regulátor Z-kruhu, určuje místo jeho vzniku	(Holečková et al., 2015) (Fleurie et al., 2014)
	LytB	NE	Hydroláza, oddělení dceřiných buněk	(De Las Rivas et al., 2002)
	PcsB	CE	Hydroláza, oddělení dceřiných buněk	(Sham et al., 2011)
	SepF	NE	Pozitivní regulátor Z-kruhu	(Fadda et al., 2003)

Buněčné dělení	SpoIIIE (homolog FtsK <i>E. coli</i>)	NE	Rozchod chromozomů a buněčné dělení	Fadda a Massidda, nepublikováno
	ZapA	NE	Pozitivní regulátor Z-kruhu	Fadda a Massidda, nepublikováno
	ZapB	NE	Pozitivní regulátor Z-kruhu	Fadda a Massidda, nepublikováno
Septální syntéza PG	DivIB (homolog FtsQ <i>E. coli</i>)	CE	Neznámá role v septální syntéze PG	(Noirclerc-Savoye et al., 2005)
	DivIC (homolog FtsB <i>E. coli</i>)	E	Neznámá role v septální syntéze PG	(Noirclerc-Savoye et al., 2005)
	FtsL	E	Neznámá role v septální syntéze PG	(Noirclerc-Savoye et al., 2005)
	FtsW	nd	Lipidová flipáza II, septální syntéza PG	(Morlot et al., 2004)
	GpsB	NE	Regulace septální a periferní syntézy PG	(Mura et al., 2017) (Rued et al., 2017)
	PBP1a	NE	Transpeptidáza a glykosyltransferáza septální a periferní syntézy PG	(Morlot et al., 2004) (Maggi et al., 2008)
	PBP2x	E	PG transpeptidáza, septální syntéza PG	(Morlot et al., 2004)
Neurčeno	PBP1b	nd	Transpeptidáza a glykosyltransferáza	(Guilmi et al., 2003) (Lovering et al., 2006)

Neurčeno	PBP2a	nd	Transpeptidáza a glykosyltransferáza	(Tsui et al., 2016)
Periferní syntéza PG	CozE	nd	Blíže neurčená role v periferní syntéze PG	(Fenton et al., 2016)
	GpsB	NE	Regulace septální a periferní syntézy PG	(Mura et al., 2017) (Rued et al., 2017)
	MltG	NE	Uvolnění nově syntetizovaných glykanových řetězců	(Tsui et al., 2016)
	MreC	CE	Blíže nepopsaná role v periferní syntéze PG	(Land a Winkler, 2011)
	MreD	CE	Blíže nepopsaná role v periferní syntéze PG	(Land a Winkler, 2011)
	PBP1a	NE	Transpeptidáza periferní a septální syntézy PG	(Morlot et al., 2004) (Maggi et al., 2008)
	PBP2b	E	Transpeptidáza periferní syntézy PG	(Kell et al., 1993) (Goffin a Ghuysen, 1998)
	RodA	E	Transport a polymerace PG prekurzorů	(Tsui et al., 2016) (Meeske et al., 2016)
	RodZ	E	Kontrola PBP1a a MltG aktivity	(Tsui et al., 2016)

Tabulka shrnuje dosud popsané proteiny účastnící se buněčného dělení a syntézy PG u *S. pneumoniae*. Pomocí zkratk je vyjádřeno, zda jde o protein esenciální (E), neesenciální (NE) či částečně esenciální v závislosti na genetickém pozadí (CE). U některých proteinů nebyla esencialita určena (nd). Převzato a upraveno z Massidda et al. (2013).

3.3 Kináza StkP

Signální dráhy jak u eukaryot, tak u prokaryot zahrnují proteinovou fosforylaci jako zásadní mechanismus přenosu signálu, ať už se jedná o přenos z vnějšího prostředí do buněk či o přenos intracelulární. Reverzibilní přenos fosfátové skupiny na fosforylovatelné zbytky aminokyselin je katalyzován enzymy, které se nazývají kinázy. Opačný proces, defosforylaci, zprostředkovávají enzymy zvané fosfatázy. Tradiční rozdělení, podle kterého je přenos signálu pomocí fosforylace serinu, threoninu a tyrozinu specifický pro eukaryotní organizmy, zatímco u prokaryot tuto signalizační funkci zajišťují výhradně dvousložkové systémy fosforylující aminokyselinové zbytky histidinu a aspartátu, bylo koncem minulého století narušeno prokázáním přítomnosti Ser/Thr a tyrosinových kináz a fosfatáz eukaryotického typu i u zástupce prokaryot *Myxococcus xanthus* (Muñoz-Dorado et al., 1991) a u methanogeních archebakterií (Smith a King, 1995). Pozdější analýza celé řady bakteriálních genomů potvrdila, že tradiční rozdělení není striktní a zjistila hojnou přítomnost ESTKs a ESTPs i u bakterií. Nejvíce genů kódujících ESTKs bylo nalezeno u zástupců patřících do kmenů proteobakterie, aktinobakterie, sinice a planktomycety (Pérez et al., 2008). Substráty ESTKs představují proteiny zapojené v regulaci řady buněčných procesů. Například ESTK u *S. pneumoniae* má vliv na virulenci (Echenique et al., 2004), u *B. subtilis* ovlivňuje tvorbu biofilmu (Madec et al., 2002), u jiných bakterií jako je *Mycobacterium tuberculosis* (Kang et al., 2005) či *Corynebacterium glutamicum* (Fiuza et al., 2008) se ESTK podílí na regulaci buněčného dělení a ustavení správného tvaru buněk. I přes značné zastoupení těchto enzymů u širokého spektra bakterií a jejich identifikaci, stále nejsou zcela objasněny informace o jejich aktivaci a substrátech. ESTKs bývají současně exprimované s jejich příslušnou fosfatázou, která je nezbytná pro regulaci jejich aktivity. Tyto fosfatázy jsou často schopné defosforylovat substráty ESTKs nebo je samotné.

Genom pneumokoka kóduje pouze jednu ESTK nazvanou StkP. Genovou analýzou bylo zjištěno, že v blízkosti *stkP* se nachází přilehlý gen pro fosfatázu PhpP. Celá tato oblast kódující geny *stkP* a *phpP* je přepisována jako jedna molekula mRNA a StkP spolu s PhpP fungují jako funkční pár (Nováková et al., 2005).

StkP je membránově vázaný enzym, jehož aktivita je závislá na přítomnosti Mg^{2+} iontů. Přestože tato kináza reguluje řadu buněčných procesů, není pro přežití bakterie v laboratorních podmínkách esenciální. StkP se skládá ze třech částí: 1) N-koncové domény, která má funkci kinázy, 2) transmembránové domény kotvící protein v membráně a 3) extracelulární C-koncové domény, která funguje jako senzor a obsahuje několik opakujících se sekvencí kódujících PASTA domény (Penicillin-binding protein And Serine/Threonine kinase Associated domain) (Yeats et al., 2002). PASTA domény jsou zásadní pro aktivaci kinázy a fosforylaci substrátů. Bylo zjištěno, že C-koncová oblast interaguje s PG a β -laktamovými antibiotiky (Maestro et al., 2011). U bakterie *Staphylococcus aureus* byl jako signální molekula, na kterou reaguje ESTK PknB, prokázán lipid II (Hardt et al., 2017). Jedná se o jednu podjednotku peptidoglykanu připojenou pomocí pyrofosátového linkeru k polyisoprenoidní kotvě. Vzhledem k velké podobnosti molekul interagujících s StkP a molekul aktivujících PknB je pravděpodobné, že molekula strukturně podobná lipidu II aktivuje i StkP. StkP tvoří homodimer prostřednictvím transmembránové a extracelulární domény, přičemž tvorba dimeru podporuje autofosforylační aktivitu kinázy (Pallová et al., 2007). StkP je aktivní během růstové fáze v širokém spektru pH od 3-9 (Nováková et al., 2005) a k inhibici její aktivity dochází po ukončení růstu (Nováková et al., 2010).

3.3.1 Funkce

StkP je kinázou regulující celou řadu buněčných procesů. Nejprve bylo zjištěno, že tato kináza má vliv na virulenci a ovlivňuje horizontální přenos genů tím, že reguluje expresi genů ComCDE operonu a působí tedy opačně, než kompetenční represor CiaRH (Echenique et al., 2004). Následně byla testována citlivost kmenů s delecí v genu pro StkP k environmentálním stresům. Takové kmeny byly citlivější ke zvýšené teplotě, sníženému pH či vyšší osmolaritě. Srovnáním celogenomových expresních profilů divokého kmene a kmene s mutací StkP bylo zjištěno, že StkP je globální regulátor transkripce skupiny genů, které hrají roli v metabolismu, syntéze pyrimidinu, opravách DNA a odpovědi k oxidativním stresům (Sasková et al., 2007). Imunofluorescenčním barvením (Giefing et al., 2010) se prokázalo, že StkP je lokalizována ve středu buňky v oblasti septa, kde se nachází i proteiny aparátu buněčného dělení. Toto zjištění, společně s faktem, že delece StkP má za následek defektní buněčnou morfologii (Nováková et al., 2010), vedlo k hypotéze, že se StkP účastní

i buněčného dělení. Tato hypotéza byla potvrzena v dalších experimentech, kdy byla lokalizace StkP v oblasti septa ověřena fúzí StkP s GFP (Green Fluorescent Protein) a kdy bylo prokázáno, že se StkP podílí i na regulaci syntézy BS a kontroluje tvorbu a uzavírání septa. Buňky s mutací v genu *stkP* jsou životaschopné v laboratorních podmínkách, ale mají prodloužený fenotyp s vícečetnými, často neuzavřenými septy (Beilharz et al., 2012; Gieffing et al., 2008).

3.3.2 Substráty StkP

StkP je kinázou, která fosforyluje široké spektrum substrátů, které hrají roli v nejrůznějších buněčných procesech. Snaha přiblížit funkci této kinázy a vysvětlit regulační síť, ve kterých je StkP zapojená, vede přes identifikaci nových substrátů pomocí porovnávání fosfoproteomů divokého a $\Delta stkP$ mutantního kmene.

Analýzou fosfoproteomu divokého kmene a kmene s delecí v genu pro StkP byla jako první substrát kinázy identifikována fosfoglukozaminmutáza (GlmM). Fosforylace tohoto proteinu pomocí StkP byla prokázána *in vitro* kinázovou reakcí. GlmM je enzym katalyzující vzájemnou přeměnu glukozamin-6-fosfátu na glukozamin-1-fosfát. Tato reakce stojí na začátku biosyntetické dráhy, ve které vzniká UDP-N-acetylglukozamin, který je nezbytnou součástí PG, lipopolysacharidů a teichoových kyselin (Nováková et al., 2005).

O čtyři roky později byl jako substrát StkP *in vitro* popsán transkripční regulátor RitR (Ulijasz et al., 2009). Fosforylace *in vivo* zatím prokázána nebyla. RitR je dvoukomponentový regulační protein, který postrádá přilehlý gen pro kinázu. Tento transkripční regulátor ovlivňuje expresi genů pro transport iontů železa do buňky a tím se podílí na udržování homeostázy železa v buňce (Ulijasz et al., 2004).

Další identifikovaný substrát představuje hypotetický protein Spr0334 (Nováková et al., 2010), který byl později pojmenován LocZ (MapZ). Jedná se o neesenciální protein, který je zodpovědný za správné umístění septa. Buňky, které mají odstraněný LocZ, vykazují různé buněčné defekty a tvarové deformace způsobené nesprávným umístěním Z-kruhu. LocZ je konzervovaný pouze mezi streptokoky, laktokoky a enterokoky, kteří nemají homology Min systému (Holečková et al., 2015).

Ve stejné práci (Nováková et al., 2010) byla jako substrát StkP identifikována i mangan-závislá anorganická pyrofosfatáza PpaC. Tato fosforylace byla prokázána jen *in vivo*. *In vitro* se ji zatím prokázat nepodařilo pravděpodobně proto, že tato *in vitro* reakce vyžaduje specifické reakční podmínky či přítomnost reakčního partnera. Pyrofosfatázy jsou nezbytné enzymy katalyzující hydrolýzu pyrofosfátu, který vzniká v buňce při běžných reakcích, jako je hydrolýza ATP či syntéza nukleotidů.

Třetím substrátem StkP, popsáným v práci Novákové (2010), je protein buněčného dělení DivIVA. DivIVA byl studován hlavně u bakterie *B. subtilis*, kde je součástí Min systému, který se skládá z MinC, MinD, MinJ a DivIVA. Interakcí MinC a MinD vzniká inhibiční komplex, který brání dělení buněk v oblasti pólů. MinCD komplex je kontrolován pomocí DivIVA a je udržován na pólech buňky i po jejím rozdělení (Marston a Errington, 1999). Pomocí imunofluorescenční mikroskopie u *S. pneumoniae* byl zjištěn unikátní lokalizační profil proteinu DivIVA. DivIVA je součástí Z-kruhu tvořeného v místě dělení, ale jeho přítomnost je obohacena i v pólech mateřské buňky. U pneumokoka se DivIVA podílí na kontrole buněčné morfologie, separaci buněk a segregaci chromozomů (Fadda et al., 2007).

Ve stejném roce byl *in vitro* prokázán další substrát StkP, a to protein FtsZ, prokaryotický homolog tubulinu (Gieffing et al., 2010), který je konzervovaný u většiny bakterií. Tento GTP vazebný protein začíná proces buněčného dělení tím, že se samouspořádává do struktury Z-kruhu uprostřed buňky a slouží jako kostra pro vazbu dalších proteinů buněčného dělení.

O dva roky později bylo zjištěno, že cílem StkP kinázy *in vitro* je i protein buněčného dělení FtsA (Beilharz et al., 2012). FtsA je široce rozšířený protein, který je u *E. coli* i *B. subtilis* lokalizován do oblasti Z-kruhu (Addinall a Lutkenhaus, 1996; Feucht et al., 2001). U pneumokoka (Mura et al., 2017) stejně jako u *E. coli* (Lutkenhaus a Donachie, 1979) se jedná o protein esenciální, zatímco *B. subtilis* (Beall a Lutkenhaus, 1992) s delecí FtsA vykazuje snížené známky životaschopnosti a sporulace. Hlavní rolí FtsZ v buněčném dělení je vazba Z-kruhu na membránu a jeho stabilizace.

In vitro a *in vivo* byla prokázána fosforylace regulátoru RR06, který je součástí dvoukomponentového systému CS06 (RR06/HK06). Tento dvoukomponentový systém kontroluje expresi důležitého povrchového adhezinu CbpA a podílí se tak na regulaci virulence u *S. pneumoniae* (Agarwal et al., 2012).

Dalším identifikovaným substrátem StkP *in vitro* je UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanine ligáza MurC (Falk a Weisblum, 2013). MurC je esenciální enzym zapojený v biosyntéze buněčné stěny, při které katalyzuje přeměnu UDP-N-acetyl-muramové kyseliny (UNAM) na UDP-N-acetyl-muramovou kyselinu s navázaným L-alaninem (UNAM-Ala).

Nejnověji objeveným substrátem StkP je hypotetický protein Spr1851, pojmenovaný Jag (SpoIIIJ associated gene). Jedná se o protein, který je homologní k Jag/SpoIIIJ asociovanému proteinu *B. subtilis* (Ulrych et al., 2016). Gen kódující Jag protein je součástí transkripční jednotky *rnpA*(spr1853)-YidC/Oxa1(spr1852)-Jag/SpoIIIJ (spr1851). Homolog *jag* genu v *B. subtilis* tvoří bicistronní operon se *spoIIIJ* genem (Errington et al., 1992), který odpovídá pneumokokovému *spr1852* kódujícímu YidC/Oxa1 membránovou invertázu. Membránové invertázy jsou enzymy vyžadované pro správné složení a inzerci membránových proteinů do membrány. Poslední složku operonu, ve kterém se nachází gen pro Jag, představuje gen *rnpA* kódující proteinovou složku ribonukleázy P. Ribonukleáza P je ribonukleoprotein s významnou rolí při úpravách RNA, zejména při úpravách 5'konců tRNA prekurzorů (Robertson et al., 1972) nebo při zpracovávání nekódujících RNA (Peck-Miller a Altman, 1991).

Podle Conserved Domain Database (CDD) (Marchler-Bauer et al., 2017) se protein Jag skládá ze třech domén, na N-konci obsahuje Jag_N doménu a na C-konci nalezneme dvě specifické domény - KH a R3H doménu (viz obrázek 3). Na úplném C-konci Jag proteinu se nachází predikovaná R3H doména, jejíž jméno je odvozeno od konzervovaných zbytků argininu a histidinu, které jsou odděleny třemi nekonzervovanými zbytky. Tato doména, schopná vázat nukleové kyseliny, je přítomna v proteinech širokého spektra organismů, které zahrnuje bakterie, zelené rostliny, houby a metazoa. Naopak R3H doména zatím nebyla identifikována u archea a *E. coli* (Grishin, 1998). S N-koncovou částí R3H domény sousedí u *S. pneumoniae* KH doména. Opět se jedná o široce konzervovanou sekvenci, jejíž

predikovaná funkce je vazba jednovláknové nukleové kyseliny a zprostředkování rozpoznání RNA v proteinech, které regulují genovou expresi (Siomi et al., 1993). Na N-konci proteinu Jag je predikována Jag_N-koncová doména, která nemá blíže určenou funkci.

Obrázek 3: Struktura proteinu Jag



Na obrázku je schematicky znázorněna struktura proteinu Jag se všemi jeho důležitými částmi: domény Jag_N, KH, R3H a místo fosforylace T89. Převzato z Ulrych et al. (2016).

U *S. pneumoniae* je protein Jag fosforylován na threoninu v pozici 89 (T89), který je součástí sekvence bez homologie ke konzervovaným doménám. Pomocí imunodetekce s protilátkou proti P-Thr bylo zjištěno, že Jag je fosforylován na dalším dosud neidentifikovaném místě. Dále byl zkoumán fenotyp buněk, které postrádají gen pro Jag. U mutantního kmene byla pozorována delší lag fáze, pomalejší růst a k dosažení stacionární fáze docházelo při nižších optických denzitách než u divokého kmene. Pomocí mikroskopie a následného měření délky buněk bylo zjištěno, že buňky mutantního kmene jsou kratší než buňky divokého kmene. Na základě těchto výsledků byl Jag označen jako protein buněčného dělení, který pomáhá ustavit správný tvar buňky (Ulrych et al., 2016).

4 Materiál a metody

4.1 Materiál

4.1.1 Chemikálie

Použité chemikálie jsou abecedně seřazeny v následující tabulce (tabulka 2). Ve sloupci označeném Zkratka/Vzorec je uvedeno označení používané v textu. Všechny uvedené chemikálie dosahovaly analytické čistoty.

Tabulka 2: Seznam použitých chemikálií

Název	Zkratka/Vzorec	Výrobce	Použití
2'- deoxyadenosin -5'-trifosfát	dATP	Promega	Nukleotidy do PCR reakcí
2'- deoxythymidin -5'-trifosfát	dTTP		
2'- deoxycytidin -5'-trifosfát	dCTP	Promega	Nukleotidy do PCR reakcí
2'- deoxyguanosin -5'-trifosfát	dGTP		
Adenosin		Sigma-Aldrich®	Příprava média C+Y
Agaróza		Sevac	Příprava DNA agarózového gelu
Akrylamid		Sigma-Aldrich®	Příprava gelu na 1D SDS PAGE
Ampicilin	Amp	Sigma-Aldrich®	Selektivní média pro <i>E. coli</i>
L-Asparagin		Sigma-Aldrich®	Příprava roztoku ADAMS III
Bacto agar		Oxoid	Příprava pevných kultivačních půd
Biotin		Sigma-Aldrich®	Příprava roztoku ADAMS I
Bromfenolová modř	BPB	Lachema	Příprava vzorkového pufru

Casiton		BD company	Příprava gelózy
Amidová čern		Lachema	Příprava roztoku amidové černě
Kompetenci stimulující peptid	CSP	Biopharm	Navození stavu kompetence při transformacích
Deoxycholát sodný	DCNa	Merck	Příprava DCNa-SDS pro izolaci chDNA a roztoku SEDS
Dodecylsulfát sodný	SDS	Serva	Příprava roztoků pro izolaci DNA, příprava roztoků pro 1D SDS-PAGE
D-glukóza		Lachema	Příprava kultivačních médií
Ethanol	EtOH	Lachema	Izolace chDNA
Ethylendiamintetraoctová kyselina	EDTA	Sigma-Aldrich®	Příprava TAE pufru a roztoku SEDS
Fenol		Sigma-Aldrich®	Příprava směsi fenol/chloroform pro izolaci chDNA
Gel Rel Nucleic Acid Stain		Biotium	Vizualizace DNA na agarózovém gelu
Glutamin		Sigma-Aldrich®	Příprava média C+Y
Glycerol		Lach-Ner	Příprava konzerv <i>S. pneumoniae</i> a <i>E. coli</i> , příprava vzorkového pufru
Glycin	Gly	Serva	Příprava elektroforetického a blotovacího pufru
Heptahydrát síranu zinečnatého	ZnSO ₄ .7H ₂ O	Sigma-Aldrich®	Příprava roztoku ADAMS II
Heptahydrát síranu železnatého	FeSO ₄ .7H ₂ O		
Hexahydrát chloridu hořečnatý	MgCl ₂ .6H ₂ O		Příprava roztoku ADAMS III

Hovězí sérový albumin, frakce V	BSA	Carl Roth®	Příprava blokovacího roztoku a roztoků primárních protilátek
Chlorid sodný	NaCl	Lach-Ner	Příprava gelosy, TBS-T, SEDS, dezintegračního pufru
Chlorid vápenatý	CaCl ₂	Sigma-Aldrich®	Příprava kompetenčního TSB média a ADAMS III
Chloroform		Lach-Ner	Příprava směsi fenol/chloroform, izolace chDNA
Cholin		Sigma-Aldrich®	Příprava roztoku ADAMS III
Izopropanol		Lach-Ner	Izolace chDNA
Kanamycin	Kan	Sigma-Aldrich®	Příprava selekčního média pro <i>S. pneumoniae</i>
Kvasinkový extrakt		Oxoid	Příprava média C+Y a LB
Kyselina chlorovodíková	HCl	Sigma-Aldrich®	Příprava média C+Y, TE pufru, SEDS
Kyselina nikotinová		Sigma-Aldrich®	Příprava roztoku ADAMS I
Kyselina octová		Lach-Ner	Příprava amidové černě
β-merkaptoethanol		Sigma-Aldrich®	Příprava vzorkového pufru
Methanol	MetOH	BDH Prolabo Chemicals	Příprava blotovacího pufru
Neopepton		Dufci	Příprava gelózy
Octan sodný		Lach-Ner	Příprava média C+Y
Panthotentát vápenatý		Sigma-Aldrich®	Příprava roztoku ADAMS I
Pentahydrát síranu měďnatého	CuSO ₄ .5H ₂ O	Lachema	Příprava roztoku ADAMS II
Peroxodisíran amonný	APS	Lachema	Příprava polyakrylamidového gelu

Pyridoxin hydrochlorid		Sigma-Aldrich®	Příprava roztoku ADAMS I
Pyrohroznan sodný		Sigma-Aldrich®	Příprava média C+Y
Riboflavin		Sigma-Aldrich®	Příprava roztoku ADAMS I
Sacharóza		Sigma-Aldrich®	Příprava média C+Y
Streptomycin	Str	Fluka	Příprava selekčního média pro <i>S. pneumoniae</i>
Tetracyklin	Tet	USB	Příprava selekčního média pro <i>S. pneumoniae</i>
Tetrahydrát chloridu manganatého	MnCl ₂ .4H ₂ O	Sigma-Aldrich®	Příprava média C+Y
Tetramethylendiamid	TEMED	Serva	Příprava polakrylamidového gelu
Thiamin chlorid		Sigma-Aldrich®	Příprava roztoku ADAMS I
Tris-hydroxymethyl-aminomethan	Tris-base	Sigma-Aldrich®	Příprava gelózy
Tris-hydroxymethyl-aminomethan hydrochlorid	Tris-HCl	Sigma-Aldrich®	Příprava TE pufru a roztoku SEDS
Tween 20		Sigma-Aldrich®	Příprava roztoku TBS-T
Vankomycin	Van	Sigma-Aldrich®	Příprava roztoku na fluorescenční barvení VAN-FL
Uridin		Sigma-Aldrich®	Příprava média C+Y

4.1.2 Bakteriální kmeny a vektory

Následující tabulka (tabulka 3) shrnuje použité bakteriální kmeny *S. pneumoniae* a *E. coli*. Kultury kmenů, které dosahovaly OD₆₀₀ = 0,3-0,4, byly skladovány v -80 °C v 15% glycerolu.

Tabulka 3: Seznam použitých bakteriálních kmenů

Kmen	Genotyp	Fenotyp	Použití	Zdroj
Sp1	<i>Rx derivate; str1, hexA</i>	StrR	Výchozí nevirulentní kmen, považován za srovnávací	(Morrison et al., 1984)
Sp70	<i>bga::pZn-divIVA-gfp</i>	TetR	Lokalizace DivIVA na pozadí divokého kmene	L. Doubravová, nepublikované výsledky
Sp157	<i>bga::pZn-gfp-ftsA</i>	TetR	Lokalizace FtsA na pozadí divokého kmene	Orietta Massida
Sp233	<i>gfp-locZ</i>	StrR, KanS	Lokalizace LocZ na pozadí divokého kmene	K. Buriánková, nepublikované výsledky
Sp295	Δjag	StrR, KanS	Stanovení morfologie kmene s úplnou delecí <i>jag</i> genu	(Ulrych et al., 2016)
Sp304	$\Delta jag::janus$ <i>bga::pZn-jag-flag</i>	TetR, KanR	Výchozí kmen pro přípravu Sp324	A. Ulrych, nepublikované výsledky
Sp306	$\Delta jag::janus$ <i>bga::pZn-jag-flag T89E</i>	TetR, KanR	Výchozí kmen pro přípravu Sp325	A. Ulrych, nepublikované výsledky
Sp307	$\Delta jag::janus$	StrS, KanR	Výchozí kmen pro přípravu: Sp295, 308, 312, 315, 316, 319, 322, 362, 370, 371, 372	A. Ulrych, nepublikované výsledky
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>(fhuA2 Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ80 Δ(lacZ)M15 gyrA96 recA1relA1 endA1 thi-1 hsdR17)</i>		Kompetentní buňky, použity k propagaci plazmidových vektorů	Invitrogen

pJWV25 je plazmid nesoucí okrajové oblasti *bga* lokusu chDNA (chromozomální DNA) *S. pneumoniae*, které umožňují integraci do chromozomu pomocí homologní rekombinace. Dále nese sekvenci pro zinkem indukovaný promotor, gen pro GFP připravený pro N-koncové fúze, ampicilinovou rezistenci pro selekci v *E. coli* a tetracyklinovou rezistenci, která umožňuje selektovat pozitivní klony *S. pneumoniae* (Eberhardt et al., 2009). V předložené práci byl tento vektor použit pro amplifikaci oblasti GFP. Dále byly v práci použity vektory z něj odvozené: pZn-Spr1851-Flag - pro přípravu kmene Sp322 s bodovou záměnou v pozici T89 ($\Delta jag\ bga::pZn-jag-flag\ T89D$) a pZn-Spr1851 pro přípravu kmene Sp370 (*jag-gfp*) exprimujícího protein Jag fúzovaný s GFP.

Janus kazeta je 1,3 kb dlouhý lineární konstrukt využívaný pro delecí genů u streptomycin rezistentních kmenů *S. pneumoniae*. Tento konstrukt nese kanamycinovou rezistenci a gen *rpsL*⁺. Po inzerci kazety do genomu je gen *rpsL*⁺ v diploidním stavu a z buněk streptomycin rezistentních se stávají buňky streptomycin senzitivní (Sung et al., 2001). Pomocí Janus kazety byl vytvořen kmen Sp295 (Δjag), který má z genomu odstraněný gen *jag* (Ulrych et al., 2016). Kmen s vloženou Janus kazetou (Sp307) byl použit pro tvorbu kmenů exprimujících mutované formy proteinu Jag z nativního lokusu.

4.1.3 Kultivační půdy a použitá antibiotika

Kultivace *S. pneumoniae* probíhala staticky při 37°C. Pro kultivaci byla použita pevná i tekutá média. Množství složek následujícího seznamu odpovídá 11 média. Do výsledného objemu byla média doplňována destilovanou vodou a následně sterilizována. Do pevných půd byl přidán 1,5% agar. Seleční média byla připravena přidáním antibiotika o příslušné koncentraci do média o teplotě 45°C. Pro selekci *S. pneumoniae* byl použit kanamycin (200 µg/ml), streptomycin (500 µg/ml) a tetracyklin (2,5 µg/ml). Ke kultivaci byla použita následující média:

- TSB medium (Oxoid) – Tryptic soy broth 30g
- Kompetenční TSB médium – k TSB médiu bylo přidáno 10 ml 0,1 mM CaCl₂; 25 ml 8% BSA; pH 8,0
- Krevní agar (LabMediaServis) – Columbia agar s přidavkem 5 % defibrilované beraní krve

- C+Y (Lacks a Hotchkiss, 1960) se skládá z následujících složek, pH 6,8:
 - PreC: L-cystein HCl 0,01125 g; octan sodný 2 g; kasein hydrolyzát 5 g; L-tryptofan 0,006 g; K₂HPO₄ 8,5 g
 - K PreC přidáno: 0,4 mM MnCl₂ 1 ml; 20% glukóza 10 ml; roztok ADAMS III 25 ml; 3% glutamin 7,3 ml; 2% pyruvát sodný 15 ml; 1,5 M sacharóza 6,3 ml; 0,2% uridin adenosin 10 ml; 10% kvasničný extrakt 25 ml; 1 M HCl 20 ml
- Gelóza - glukóza 1 g; NaCl 5 g; neopepton 5 g; Tris-base 1,25 g; casiton 10 g; agar 10 g

Kultivace *E. coli* probíhala za aerobních podmínek ve 37°C při stálém třepání v tekutém médiu. Pro kultivaci *E. coli* bylo použito LB médium složené z následujících složek: trypton 10 g; kvasinkový extrakt 5 g; NaCl 10 g; pH 7,5 a doplněno do 1 l destilovanou vodou. Pevné selekční médium bylo připraveno přidáním 1,5% agaru a ampicilinu o koncentraci 100 µg/ml.

4.1.4 Oligonukleotidy

Následující tabulka (tabulka 4) představuje seznam použitých oligonukleotidů. Oligonukleotidy byly navrženy prostřednictvím programu SeqBuilder (Lasergene) a vyrobeny firmou Sigma-Aldrich®.

Tabulka 4: Seznam oligonukleotidů

Název	Sekvence 5'→3'	Použití
AU57 F	ATACGCAGAGATGGAGAAAAAT	Amplifikace oblasti po směru transkripce genu <i>jag</i>
AU60 R	ACATATACCCTACTGTTGCTTT	Amplifikace oblasti proti směru transkripce genu <i>jag</i>
AU101 F	CAACCACATGACCAAGGTCAACATCT TCTTCACTAACCGTCTTCACA	Místně specifická mutageneze genu <i>jag</i> – záměna T89 za D
AU102 R	TGTGAAGACGGTTAGTGAAGAAGAT GTTGACCTTGGTCATGTGGTTG	Místně specifická mutageneze genu <i>jag</i> – záměna T89 za D
AU103 R	ACTTATCGTCGTCATCCTTGTAATCTA	Příprava zkrácené formy proteinu

	CTTCCGTAGCTACTTGTTTC	Jag – Jag Δ 188-328
AU104 F	GATTACAAGGATGACGACGATAAGT AAGTAAAATCAGGTTTATCCTGAT	Příprava zkrácených forem proteinu Jag – Jag Δ 188-328 a Jag Δ 3-53
AU107 R	AACAGTCGTTTCACTAATCGCTACCA CTACCAGATTCCTCC	Příprava zkrácené formy proteinu Jag – Jag Δ 3-53
AU108 F	GCGATTAGTGAAACGACTGTT	Příprava zkrácené formy proteinu Jag – Jag Δ 3-53
AU109 R	TATCGTCGTCATCCTTGTAATCTTCTG TATCTACAACAACATAGC	Příprava zkrácené formy proteinu Jag – Jag Δ 3-53
AU117 R	ACCAGATCCTCTAGATTCTGTATCTA CAACAACATA	Příprava Jag-GFP a C-koncové fúze proteinu Jag Δ 188-328 s GFP
AU118 F	GTTGTAGATACAGAATCTAGAGGATC TGGTGGAGAAGCTGCAGCTAAAGCTG GAACTAGTATCAGCAAAGGAGAAGA ACTTTTC	Příprava Jag-GFP a C-koncové fúze proteinu Jag Δ 3-53 s GFP
AU147 R	ACTTATCGTCGTCATCCTTGTAATCTT CTGCACGGTGTTTCGACAT	Příprava zkrácené formy proteinu Jag – Jag Δ 268-328
AU150 R	TTATTTGTAGAGCTCATCCATG	Příprava fúzního proteinu Jag-GFP
AU151 F	CATGGATGAGCTCTACAAATAAGTAA AATCAGGTTTATCCTGAT	Příprava fúzního proteinu Jag-GFP
AU152 F	TCTAGAGGATCTGGTGGAG	Příprava proteinu Jag-GFP Δ 188-328
AU153 R	CTCCACCAGATCCTCTAGATACTTCC GTAGCTACTTGTTTC	Příprava proteinu Jag-GFP Δ 3-53
LN142	AGGACAAGAGTTTTTCTTTGG	Ověřování správné integrace vektorů odvozených od pJWV25 do <i>bga</i> lokusu

4.1.5 Enzymy

Phusion polymeráza (New England Biolabs - NEB)

Purple Taq polymeráza (Top Bio)

Pfu ultra HF DNA polymeráza (Agilent)

PvuI (NEB)

Dpn (NEB)

Benzonáza (Merck)

Proteináza K (Roche)

4.1.6 Protilátky

- Anti-P-Thr (Cell Signalling Technology) - primární králičí polyklonální protilátka proti P-Thr, ředění 1:70000.
- Anti-Jag protilátka (Apronex) – primární protilátka proti proteinu Jag, ředění 1:20000.
- Anti-RpoA (Apronex) – primární protilátka proti α podjednotce RNA polymerázy, ředění 1:10000.
- Anti-GFP (Santa Cruz Biotechnology) - myší monoklonální protilátka proti GFP konjugovaná s křenovou peroxidázou, ředění 1:10000.
- Anti-rabbit IgG-peroxidáza (Sigma-Aldrich®) - sekundární protilátka proti králičímu IgG konjugovaná s křenovou peroxidázou, ředění 1:5000.

4.1.7 Roztoky, pufry a standardy

Příprava média C+Y:

ADAMS I (objem 500 ml): biotin 75 mg; kyselina nikotinová 75 mg; pyridoxin hydrochlorid 87,5 mg; pantotenát vápenatý 300 mg; thiamin hydrochlorid 80 mg; riboflavin 35 mg; pH 7,0; sterilizace 15 min autokláv

ADAMS II (objem 500 ml): $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 500 mg; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 500 mg; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 500 mg; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 200 mg; sterilizace 15 min var

ADAMS III (objem 100 ml): ADAMS I 16 ml; ADAMS II 0,4 ml; L-asparagin 0,175 g; cholin 0,02 g; CaCl_2 0,05 g; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 2 g; pH 7,6, sterilizace filtrací

DNA agarózová elektroforéza:

TAE pufr - 40 mM Tris; 2 mM EDTA; pH 8,5

Gel Loading Dye Purple 6x (NEB)

GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific)

Izolace chDNA:

DCNa-SDS - 0,5% deoxycholát sodný; 0,25% SDS

NaCl-EDTA - 150 mM NaCl; 30 mM EDTA; pH 8,0

SEDS - NaCl-EDTA : DCNa-SDS (24:1) - 10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA; pH 8,0

TE pufr - 10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA; pH 8,0

SDS PAGE:

Elektroforetický pufr - 0,025 mM Tris; 0,192 M glycín; 0,1% SDS; pH 8,3

Vzorkový pufr 5x - 350 mM Tris; 20% glycerol; 15% SDS; 25% β-merkapt ethanol;
bromfenolová modř; pH 6,8

Color Prestained Protein Standard Broad Range (NEB)

Izolace a přenos proteinů, imunodetekce:

Blotovací pufr - 48 mM Tris; 39 mM glycín; 0,0375% SDS; 20% methanol

Blokovací pufr - TBS-T pufr, 5% BSA

Dezintegrační pufr - 10 mM Tris; 100 mM NaCl; pH 7,5

Roztok TBS-T - 20 mM Tris; 137 mM NaCl; 0,05% Tween-20; pH 7,6

Amidová čern - 40% metanol; 10% kyselina octová; 0,1% amidová čern

4.1.8 Komerční soupravy a membrány

Následující tabulka (tabulka 5) shrnuje použité komerční soupravy, zahrnuta je i membrána pro přenos proteinů z polyakrylamidového gelu.

Tabulka 5: Komerční soupravy a kity

Název	Výrobce	Použití
Min Elute™ Reaction Cleanup Kit	Qiagen	Přečištění fragmentů DNA po PCR reakci
QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen	Izolace DNA z agarózového gelu
QIAprep® Spin Miniprep Kit	Qiagen	Izolace plazmidové DNA
Pierce® BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific	Měření koncentrace proteinů
SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate	Thermo Scientific	Vyvolání chemiluminiscenčního signálu při imunodetekci
WesternBright ECL HRP substrate	Advantisa	
QuikChange® II Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene	Místně specifická mutageneze
Immobilon®-P	Millipore	Membrána pro přenos proteinů z polyakrylamidového gelu
BODIPY® FL Vancomycin (VanFL)	Molecular Probes	Lokalizace syntézy buněčné stěny

4.1.9 Laboratorní přístroje, počítačová analýza, software

Centrifugy:

Centrifuge 5417C, Centrifuge 5424 (Eppendorf)

Biofuge pico (Heraeus Instruments)

Cyklery:

Mastercycler gradient (Eppendorf)

BIOER (GenePro)

Elektroforézy:

OWL EASYCAST™ B1A (ThermoScientific)

ATTO (Atto)

Spektrofotometry:

DU-730 Life Science UV/Vis Spectrophotometer (Beckman Coulter)

Evolution™ 201/220 UV-Visible Spectrophotometer (Thermo Scientific)

Váhy:

Sartorius - handy (Sartorius)

Sartorius - laboratory (Sartorius)

Vodní lázně:

Julabo 7A, 5M, U3 (Julabo)

Vortex:

VX-200 Lab Vortexer Vortex Mixer (Labnet)

Ostatní přístroje:

FastPrep FP120 (ThermoSavant)

GEL BOX, VERTICAL BLOTTER (Labnet)

Magnetická míchačka (ThermoScientific)

Třepačka Innova®42 – Incubator Shakers Series (New Brunswick Scientific)

G:Box Chemi XRQ instrument (SynGene)

Olympus CellR IX 81 microscope (Olympus)

Olympus FV2T Digital B/W Fireware Camera (Olympus)

Programy a software:

DNA STAR Lasergene, verze 8.1 – sestavování genetických map

Cell^R Version 2.0 software – zobrazování obrazu z kamery FV2T Digital B/W

MicrobeTrackerSuite, verze 0.937 – měření velikosti buněk

GraphPad Prism, verze 3.0. – statistická analýza velikosti buněk, příprava grafů

ImageJ - úprava obrázků

Coli Inspector, ObjectJ - analýza fluorescenčních mikroskopických obrázků

Quantity One software, verze 4.6.3 (Bio-Rad) - analýza signálu imunodetekcí

4.2 Metody

4.2.1 Manipulace s DNA

4.2.1.1 PCR

Metoda polymerázové řetězové reakce (PCR – Polymerase Chain Reaction) je založena na mechanismu replikace a slouží k rychlému a snadnému namnožení určitého úseku DNA. Cílové úseky, které mají být namnoženy, jsou definovány pomocí krátkých oligonukleotidů, ze kterých amplifikace probíhá. Jeden cyklus PCR reakce probíhá prostřednictvím třech kroků – 1) denaturace DNA, 2) nasednutí oligonukleotidů na řetězců DNA a 3) elongace. Jednotlivé kroky probíhají za různých teplot, a proto se v reakci využívá termostabilní bakteriální DNA polymeráza. Teplotu vhodnou pro nasedání oligonukleotidů (T_m , °C) lze vypočítat podle vzorce $T_m = 4\text{ °C} \times (G + C) + 2\text{ °C} \times (A + T)$. Doba elongace závisí na délce amplifikované oblasti a byla zvolena podle pokynů výrobce. Počet cyklů pro amplifikaci templátu byl 35, pokud není uvedeno jinak. Pro amplifikaci chDNA či DNA plazmidů byla používána Phusion polymeráza (NEB).

V této práci byla často využívána metoda fúzní PCR. Díky této metodě lze spojit fragmenty s překryvnými částmi v jeden úsek DNA. Tato reakce probíhala stejně jako klasická PCR, ale oligonukleotidy jednotlivých reakcí byly navrženy tak, aby obsahovaly překryvné sekvence, díky kterým lze jednotlivé úseky spojit dohromady.

Pro kontrolu vložení či odstranění konstruktů do chromozomu *S. pneumoniae* byla používána metoda koloniové PCR reakce. Při této PCR se jako templát do reakce přidává přímo část kolonie odebraná sterilním párátkem z pevného média nebo 2 µl tekuté kultury. Amplifikace byla zprostředkována Purple Taq polymerázou (Top Bio) za přídavku 10% Tweenu 20, který rozrušuje buněčné stěny. Reakční podmínky byly zvoleny dle pokynů výrobce.

4.2.1.2 Agarózová gelová elektroforéza, extrakce z gelu

K izolaci a analýze DNA byla použita horizontální agarózová elektroforéza v TAE pufru. Základním principem této metody je pohyb nabitých molekul v elektrickém poli. Nukleové kyseliny nesou záporný náboj díky fosfátové skupině a pohybují se tedy k anodě. Pohyblivost DNA v agarózovém gelu ve stejnosměrném poli závisí na koncentraci gelu, konformaci molekuly, velikosti molekuly, aplikovaném napětí, či složení elektroforetického pufru. Hustota gelu byla volena podle velikosti dělených fragmentů. Pro zviditelnění jednotlivých fragmentů pod UV světlem byl do gelu přidán Red Gel (Roche). K nanášení vzorků na gel docházelo po přidání Gel Loading Dye Purple 6x (NEB). K určení velikostí fragmentů sloužil standard GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific).

Jednotlivé fragmenty byly izolovány z gelu pomocí komerční soupravy QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen) podle pokynů výrobce. Pokud vzorek po PCR reakci obsahoval pouze jeden požadovaný fragment, následovalo přečištění směsi po PCR pouze pomocí soupravy Min Elute™ Reaction Cleanup Kit (Qiagen) opět dle pokynů výrobce.

4.2.1.3 Místně specifická mutagenese

Tato metoda se používá pro *in vitro* mutagenesi úseku DNA, během níž dochází ke vnesení mutace do přesně určeného místa pomocí oligonukleotidů. Během tohoto postupu je plazmid amplifikován z překryvných oligonukleotidů, které obsahují zaměněnou sekvenci. Následně dochází ke štěpení mateřského vlákna a v reakční směsi zůstávají pouze vlákna nesoucí požadovanou záměnu. V této práci byla tato metoda použita pro místně specifickou záměnu T89 za D.

K vytvoření konstruktů nesoucího místně specifickou záměnu byla použita komerční souprava QuikChange® II Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) podle pokynů výrobce. Jako templát do PCR reakce posloužil vektor pZn-Spr1851-Flag (Ulrych et al., 2016),

přičemž samotná reakce probíhala z překryvných oligonukleotidů AU101 a AU102. Po skončení PCR reakce byla ke směsi přidána DpnI restriktáza, která specificky štěpí methylované sekvence. Takto připravený vektor byl označen jako pZn-Spr1851-Flag T89D.

4.2.1.4 Izolace chDNA

Do 10 ml TSB média bylo zaočkováno 200 μ l z konzervy. Kultura byla pěstována do $OD_{600} = 0,5$. Kultura byla stočena (10 min/2760 g), supernatant odstraněn a pelet resuspendován ve 250 μ l roztoku SEDS. Vzorek byl inkubován 10 minut při 37 °C, dokud nedošlo k lyzi buněk. Dále byly proteiny ve vzorku degradovány přidáním 5 μ l proteinazy K (2 mg/ml) a 15minutovou inkubací při 56 °C. Po inkubaci bylo k vzorku přidáno 250 μ l TE pufru a 500 μ l směsi fenol/chloroform (1:1). Vzorek byl zamíchán důsledným překlápěním v ruce a centrifugován (10 min/17949 g). Vodná (horní) fáze byla odebrána a smíchána s 500 μ l chloroformu. Vzorek byl opět stočen (10 min/17949 g) a k odebrané vodné (horní) fázi bylo přidáno 50 μ l 3M NaOAc a 500 μ l izopropanolu, čímž došlo k vysrážení chDNA. Vzorek byl promíchán a stočen (10 min/17949 g). Po odstranění supernatantu byl pelet promyt 500 μ l 80% EtOH. Po centrifugaci (5 min/17949 g) a odstranění zbytků EtOH byl pelet obsahující chDNA rozpuštěn ve 100 μ l vody.

4.2.1.5 Štěpení DNA

Restrikční enzymy umožňují definované štěpení v určité palindromické sekvenci dvouvláknové DNA. Reakční podmínky pro restrikční enzymy použité v této práci (DpnI a PvuI) od firmy NEB byly stanoveny podle pokynů výrobce. Fragmenty DNA byly přečištěny pomocí sady Min EluteTM Reaction Cleanup Kit (Qiagen).

4.2.2 Manipulace s proteiny

4.2.2.1 Izolace proteinů – mechanická dezintegrace buněk pro frakcionaci

Do 150 ml TSB média byly zaočkovány 3 ml kultury *S. pneumoniae* a kultivovány při 37 °C do $OD_{600} = 0,6$. Po následné centrifugaci (5 min/8960 g/4 °C) a odsátí zbytku média byly pelety resuspendovány ve 3 ml dezintegračního pufru. Ke vzorku bylo přidáno 15 μ l inhibitoru proteáz, 1,5 μ l benzonázy a skleněné kuličky. Vzorek byl homogenizován s využitím přístroje FastPrep FP120 (ThermoSavant) s tímto nastavením: rychlost 4,5 m/sec, čas 20 vteřin, teplota 4 °C. Po jednom cyklu byl vzorek uložen na 2 minuty do ledu. Tento cyklus byl opakován čtyřikrát. Následovalo stočení vzorku (10 min/2760 g/4 °C). Supernatant byl odebrán do čisté mikrozkušavky a centrifugací (2 hod/20817 g/4 °C) tohoto hrubého proteinového extraktu (HE) byly odděleny membránová (MF) a cytoplazmatická frakce (CF).

4.2.2.2 Izolace proteinů – chemická dezintegrace buněk

Z exponenciálně rostoucí kultury bylo do mikrozkušavky odebráno množství, které odpovídá 1 ml kultury o $OD_{600} = 0,4$. Buňky byly 2 minuty točeny ve stolní centrifuze na 17949 g. Supernatant byl odstraněn a buňky byly ještě jednou krátce stočeny. Po odsátí zbytku média byla peleta resuspendována ve 20 μ l roztoku SEDS. Následovala 10minutová inkubace ve 37 °C. Následně bylo ke vzorku přidáno 20 μ l 2x vzorkového pufru. Po přidání pufru byl vzorek 5 minut vařen při 100 °C. Na 1D SDS-PAGE bylo nanášeno 15 μ l takto připraveného vzorku.

4.2.2.3 Stanovení koncentrace proteinů

Koncentrace proteinů ve vzorku byla stanovována pomocí komerční soupravy Pierce® BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific), dle pokynů výrobce. Základem této metody je kolorimetrické reakce, která využívá kyselinu bicinchoninovou (BCA), která tvoří komplex s ionty mědi, které se uvolní po reakci Cu^{2+} s peptidovou vazbou proteinů. Kalibrační křivka byla sestavena dle pokynů výrobce z roztoku proteinu BSA o známých koncentracích. Hodnota absorbance byla měřena při vlnové délce 562 nm. Proložením kalibrační křivky přímkou byla získána rovnice regrese, podle které byla dopočítána koncentrace proteinů ve vzorcích.

4.2.2.4 Polyakrylamidová elektroforéza v přítomnosti SDS

1D SDS-PAGE je metoda pro separaci proteinů na základě jejich elektroforetické pohyblivosti, závislé na jejich molekulové hmotnosti. SDS ve vzorku způsobí denaturaci proteinu a obalí ho, čímž mu udělí záporný náboj.

Zkoumané vzorky byly před nanesením smíchány s vzorkovým pufrem a inkubovány 5 minut při 100 °C. Samotná elektroforéza probíhala v elektroforetickém pufru při napětí 15 V/cm² ve vertikálním uspořádání v aparatuře od společnosti ATTO corporation. V této práci byl použit 4% zaostřovací gel a 12% separační gel, jejichž složení je uvedeno v následující tabulce (tabulka 6).

Tabulka 6: Složení polyakrylamidového gelu na 1D SDS-PAGE

	H ₂ O	30% akrylamid	1,5M Tris, pH 8,8	0,5 M Tris, pH 6,8	10% SDS	10% APS	TEMED	Objem
4% zaostřovací	3,6 ml	800 µl	-	1,5 ml	60 µl	60 µl	7,5 µl	6 ml
12% separační	6,6 ml	8 ml	5 ml	-	200 µl	200 µl	20 µl	20 ml

4.2.2.5 Přenos proteinů na membránu a jejich detekce („western blot“)

Aby na proteinech rozdělených pomocí 1D SDS-PAGE mohla být provedena imunodetekce, byly přeneseny na PVDF membránu Immobilon®-P (Millipore). Membrána byla nejdříve krátce smočena v methanolu a následně v blotovacím pufru. K přenosu proteinů docházelo metodou mokrého elektroblotu, který probíhal 30 minut při 360 mA v aparatuře GEL BOX VERTICAL BLOTTER (Labnet) či Trans-Blot® Cell (Bio-Rad) podle pokynů výrobce. Na takto připravených membránách probíhala imunodetekce podle následujícího popisu.

Imunodetece fosforylovaných proteinů, proteinu Jag a RpoA probíhala postupem, který je shrnut v následující tabulce (tabulka 7). K zachycení chemiluminiscenčního signálu byl použit přístroj G:Box Chemi XRQ (SynGene).

Tabulka 7: Imunodetekce fosforylovaných proteinů, proteinu Jag a RpoA

Inkubace membrány	Fosforylované proteiny	Protein Jag	Protein RpoA
Blokovací roztok	5% BSA v TBS-T, 30 minut	5% BSA v TBS-T, 30 minut	3% BSA v TBS-T, 30 minut
Primární protilátka	Anti-P-Thr (Cell Signalling Technology) 1:70000 v 1% BSA v TBS-T, přes noc	Anti-Jag (Apronex) 1:20000 v 1% BSA v TBS-T, přes noc	Anti-RpoA (Apronex) 1:10000 v 1% BSA v TBS-T, přes noc
Promytí	3x10 min v TBS-T		
Sekundární protilátka	Anti-Rabbit konjugovaná s křenovou peroxidázou (Sigma-Aldrich®) 1:5000 v TBS-T		
Promytí	3x10 min v TBS-T		
Substrát	WesternBright ECL HRP substrate (Advantisa)	SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific)	SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific)

Membrána pro imunodetekci GFP signálu byla inkubována v blokovacím roztoku 5% BSA v TBS-T přes noc. Následovala inkubace s primární Anti-GFP protilátkou (Santa Cruz Biotechnology) konjugovanou s křenovou peroxidázou ředěnou 1: 20000 v 1% BSA v TBS-T po dobu jedné hodiny. Po promytí membrány 3x10 minut v TBS-T roztoku byl chemiluminiscenční signál vyvolán nanesením substrátu WesternBright ECL HRP substrate (Advantisa). Tento signál byl zachycen pomocí přístroje G:Box Chemi XRQ instrument (SynGene).

4.2.3 Manipulace s buňkami *S. pneumoniae*

4.2.3.1 Kultivace *S. pneumoniae*, měření růstu

Kmeny *S. pneumoniae* byly kultivovány v pevném (gelóza, krevní agar) i tekutém médiu (TSB, C+Y). Kmeny kultivované na pevných půdách byly ukládány do 37 °C. Kultivace v tekutém médiu probíhala při 37 °C ve vodní lázni. Pro indukci exprese proteinů byl do tekutého média přidán ZnSO₄ v různých koncentracích.

Konzervy jednotlivých kmenů byly připravovány následovně. Do 10 ml média bylo zaočkováno 200 μ l kultury o $OD_{600} = 0,4$ a kultivace probíhala do dosažení $OD_{600} = 0,4$. Poté byla kultura rozpipetována po 750 μ l do mikrozkušavek, do kterých bylo přidáno 250 μ l 60% glycerolu. Připravené konzervy byly skladovány v $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Růstové křivky byly měřeny v TSB médiu pomocí spektrofotometru Evolution™ 201/220 UV-Visible (Thermo Scientific). Měření probíhalo automaticky každých deset minut po dobu osmi hodin při vlnové délce 600 nm. Prezentované výsledky vycházejí ze třech nezávislých měření, kdy jednotlivé vzorky byly měřeny v duplikátech.

4.2.3.2 Transformace DNA do *S. pneumoniae*

Transformace buněk *S. pneumoniae* probíhala dle následujícího protokolu v kompetenčním TSB médiu. K 950 μ l kompetenčního média bylo přidáno 50 μ l kultury z konzervy, 250 ng/ml CSP a DNA (1 μ g chDNA, 20-100 ng PCR produktu či plazmidové DNA). Následovala statická inkubace transformační směsi 2,5 hodiny při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po inkubaci byla kultura ředěna a ředění $0-10^{-3}$ byla vyseta na misky a zalita gelózou obsahující příslušné antibiotikum o požadované koncentraci. Ředění 10^{-4} a 10^{-5} byla vyseta na misky a zalita gelózou bez antibiotika jako kontrola experimentálního uspořádání. Jako pozitivní kontrola byla použita chDNA kmene Sp5, která kóduje gen pro rezistenci k ampicilinu. Z této transformace byla vyseta ředění 10^{-2} a 10^{-3} , která byla zalita gelózou s rifampicinem, zatímco ředění vyšší gelózou bez antibiotika. Následovala jednodenní kultivace v termostatu při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

V případě jednokrokové selekce byly narostlé klony přeočkovány na krevní misky obsahující patřičné antibiotikum, ke kterému požadované klony vykazovaly rezistenci, a inkubovány 24 hodin při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

V případě dvoukrokové selekce byly narostlé klony přeočkovány na krevní agar, který obsahoval antibiotikum, ke kterému tyto klony nesly rezistenci. Následovala 24hodinová kultivace při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Vyroslé klony byly následně přeočkovány na 2 krevní misky – na jednu s antibiotikem, ke kterému byly rezistentní a na druhou s antibiotikem, ke kterému byly citlivé. Porovnáním nárůstu na těchto dvou miskách byly určeny pozitivní klony.

4.2.4 Manipulace s buňkami *E. coli*

4.2.4.1 Kultivace *E. coli*

Kmeny *E. coli* byly kultivovány při 37 °C. V tekutém LB médiu probíhala kultivace za stálého třepání. Pro kultivaci na pevném povrchu byl do LB média přidán 1,5% agar. Média pro selekci byla připravena přidáním antibiotika o požadované koncentraci.

4.2.4.2 Transformace DNA do *E. coli*

Transformace kompetentních buněk *E. coli* byla prováděna pomocí teplotního šoku. 100 µl zmražených kompetentních buněk *E. coli* DH5α bylo rozmrazeno při 4 °C. Po rozmražení k nim bylo přidáno 10 µl směsi z PCR reakce a buňky byly inkubovány 30 minut na ledu. Teplotní šok byl zprostředkován dvouminutovou inkubací ve 42 °C a následnou 1,5minutovou inkubací na ledu. Poté bylo k buňkám přidáno 900 µl LB média vytemperovaného na 37 °C. Po hodinové inkubaci při 37 °C byla směs vyseta na pevné LB médium s příslušným antibiotikem. Následovala inkubace při 37 °C do dalšího dne.

4.2.4.3 Izolace plazmidu

Kultury pro izolaci plazmidu byly zaočkovány do 10 ml tekutého média s příslušným antibiotikem. Kultivace probíhala do druhého dne za stálého třepání při 37 °C. Samotná izolace plazmidu probíhala s použitím komerční sady QIAprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen) dle pokynů výrobce.

4.2.5 Mikroskopie

Všechny mikroskopické snímky byly pořízené pozorováním živých preparátů pomocí mikroskopu Olympus CellR IX 81 (Olympus) s imerzním objektivem 100x O2PH-UPLFLN/1.3 N.A. a zachycené kamerou Olympus FV2T Digital B/W Fireware (Olympus). Preparáty byly připraveny nanesením 3 µl vzorku z čerstvě narostlých kultur na podložní sklíčko a překryty agarózovým bločkem.

Mikroskopické snímky pořízené v režimu fázového kontrastu byly použity pro analýzu velikosti buněk, která probíhala v programu MicrobeTrackerSuite. Tento program automaticky rozpoznává obrysy buněk a měří zvolené parametry. Nejdůležitějším měřeným parametrem této práce byla délka buněk, která byla dále analyzována ve statistickém

programu GraphPad Prism. Statistická významnost rozdílů délek buněk jednotlivých kmenů byla porovnávána pomocí neparametrického Mann-Whitneyho testu, přičemž o jejich rozdílnosti vypovídala P-hodnota menší než 0,05.

K určení lokalizace proteinů syntézy buněčné stěny, byly buňky barveny roztokem fluorescenčně značeného vankomycinu (VAN-FL). Dle pokynů výrobce byl připraven roztok VAN-FL, který se skládal ze 100 µg BODIPY[®] FL Vancomycin (Molecular Probes), 190 µl methanolu a vankomycinu (Sigma-Aldrich[®]) o finální koncentraci 1 µg/µl. Pracovní roztok byl připraven naředěním pomocí methanolu na koncentraci 0,2 µg/µl. Barvení buněk Van-FL probíhalo dle pokynů výrobce a to tak, že k 1 ml kultury *S. pneumoniae* v exponenciální fázi byl přidán 1 µl pracovního roztoku VAN-FL. Vzorek byl inkubován 5 minut při 37 °C. Mikroskopie probíhala s použitím GFP filtru.

5 Výsledky

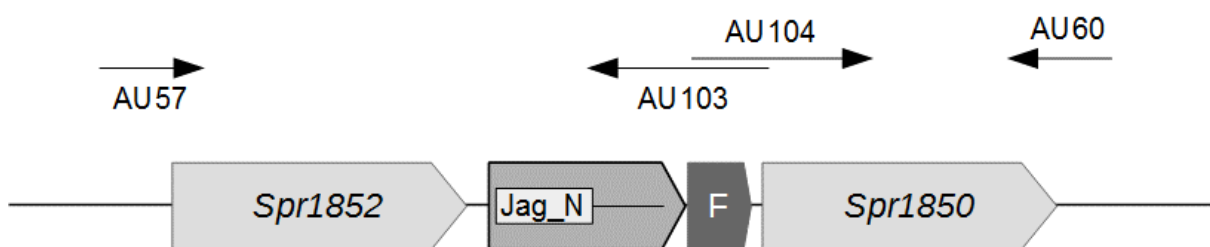
5.1 Příprava mutantních kmenů *S. pneumoniae*

Za účelem studia úlohy proteinu Jag v buněčném dělení bylo vytvořeno několik nových kmenů. Pro studium funkce tohoto proteinu byly kmeny s úplnou či částečnou delecí v genu *jag*. Stanovení lokalizace proteinu v buňce probíhalo díky kmenům exprimujícím protein Jag či jeho zkrácené formy fúzované s GFP. Vliv fosforylace proteinu Jag na buněčné dělení byl testován pomocí mutantních kmenů nesoucích fosfomimetickou záměnu na T89. Seznam vytvořených kmenů je uveden v tabulce (tabulka 8) na konci kapitoly.

5.1.1 Příprava kmenů exprimujících zkrácené formy proteinu Jag

Pro určení funkce C-koncové domény proteinu Jag byl vytvořen kmen Sp315 (*jag* Δ 188-328). Připravený kmen má odstraněné obě C-koncové domény a zbývající N-koncovou doménu s interdoménovou oblastí má označenou FLAG-epitopem. Ve třech PCR reakcích došlo k vytvoření konstruktů pro delecí C-koncových domén. V první reakci byla pomocí oligonukleotidů AU57 a AU103 amplifikována N-koncová oblast *jag* genu spolu s oblastí odpovídající sekvenci před tímto genem ve směru transkripce. Část oligonukleotidu AU103 nese sekvenci komplementární k AU104, který byl spolu s AU60 použit v druhé PCR reakci k amplifikaci oblasti odpovídající sekvenci za genem *jag* ve směru transkripce. Oligonukleotid AU104 obsahuje sekvenci pro FLAG-epitop. Jako templát pro obě tyto reakce byla použita chDNA divokého kmene Sp1. Oba fragmenty byly následně spojeny a amplifikovány pomocí fúzní PCR z oligonukleotidů AU57 a AU60. Spojení fragmentů ve fúzní PCR bylo zprostředkováno pomocí vzájemných koncových komplementárních sekvencí, které byly zavedeny pomocí oligonukleotidů AU103 a AU104. Takto vzniklý konstrukt byl pojmenován Δ C-terminus *jag* a je znázorněn na obrázku 4.

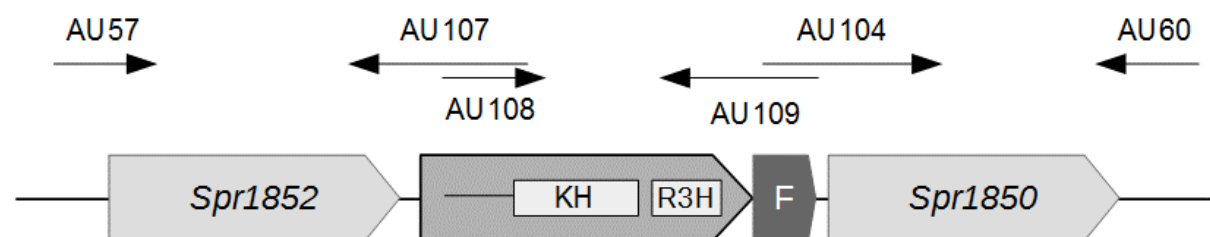
Obrázek 4: Schéma konstruktů Δ C-terminus jag



Oblast genu *jag* je znázorněna pětiúhelníkem s černým obrysem, ve kterém je znázorněna *Jag_N* doména a interdoménová oblast, kterou představuje středová vodorovná čára. Sekvence odpovídající FLAG-epitopu je znázorněna tmavě šedým pětiúhelníkem označeným F. Šipky znázorňují oligonukleotidy použité k amplifikaci. Templátem pro jednotlivé reakce byla chDNA *Sp1*. Oblast FLAG-epitop byla do sekvence zavedena pomocí překryvných oblastí oligonukleotidů AU103 a AU104.

Pro přiblížení funkce N-koncové domény (*Jag_N*) proteinu *Jag*, byl vytvořen kmen *Sp316* (*jag* Δ 3-53) s odstraněnou N-koncovou doménou. C-koncové domény (KH a R3H) s interdoménovou oblastí zůstaly zachovány a byly označeny FLAG-epitopem. Příprava konstruktů probíhala ve čtyřech krocích. Nejprve byla amplifikována oblast odpovídající sekvenci před genem *jag* ve směru transkripce pomocí oligonukleotidů AU57 a AU107. Oligonukleotid AU107 obsahuje komplementární oblast k oligonukleotidu AU108. Následně došlo pomocí oligonukleotidů AU108 a AU109 k amplifikaci oblasti genu *jag* bez *Jag_N* domény. Oligonukleotid AU109 obsahuje sekvenci pro FLAG-epitop. Další krok představovala amplifikace oblasti odpovídající sekvenci za genem *jag* ve směru transkripce pomocí oligonukleotidů AU104 a AU60. Templát pro tyto reakce tvořila chDNA divokého kmene *Sp1*. Všechny tři takto získané PCR fragmenty byly jako templát použity v následné fúzní PCR reakci, při které amplifikace probíhala z oligonukleotidů AU57 a AU60. Takto připravený konstrukt byl nazván Δ N-terminus *jag* (viz obrázek 5).

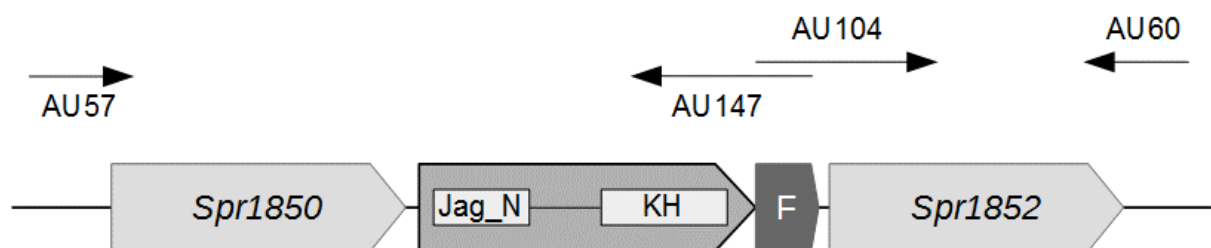
Obrázek 5: Schéma konstruktů Δ N-terminus jag



Oblast genu *jag* je znázorněna pětiúhelníkem s černým obrysem, ve kterém jsou znázorněny C-koncové domény a interdoménová oblast, kterou představuje středová vodorovná čára. Sekvence odpovídající FLAG-epitopu je znázorněna tmavě šedým pětiúhelníkem označeným F. Šipky znázorňují oligonukleotidy použité k amplifikaci.

Za účelem přiblížení funkce R3H domény byl připraven kmen Sp362 (*jag* Δ 268-328) s odstraněnou R3H doménou, přičemž FLAG-epitop byl připojen k zachované KH doméně. Příprava konstruktů probíhala ve dvou PCR reakcích. V první reakci byla pomocí oligonukleotidů AU57 a AU147 amplifikována oblast před genem *jag* ve směru transkripce, oblast zahrnující Jag_N doménu, interdoménovou sekvenci a KH doménu proteinu Jag. Oligonukleotid AU147 obsahuje sekvenci překrývající se se sekvencí v oligonukleotidu AU104, který byl použit v následující reakci. Oligonukleotid AU104 nesoucí sekvenci pro FLAG-epitop byl společně s AU60 použit k amplifikaci oblasti po směru transkripce genu *jag*. Jako templát pro jednotlivé reakce byla použita chDNA Sp1. Následná fúzní PCR reakce pomocí oligonukleotidů AU57 a AU60 oba fragmenty spojila v konstrukt pojmenovaný Δ R3H *jag* (obrázek 6).

Obrázek 6: Schéma konstruktů Δ R3H *jag*



Oblast genu *jag* je znázorněna pětiúhelníkem s černým obrysem, který obsahuje Jag_N a KH doménu s interdoménovou oblastí, kterou představuje středová vodorovná čára. Sekvence odpovídající FLAG-epitopu je znázorněna tmavě šedým pětiúhelníkem označeným F. Šipky znázorňují oligonukleotidy použité k amplifikaci.

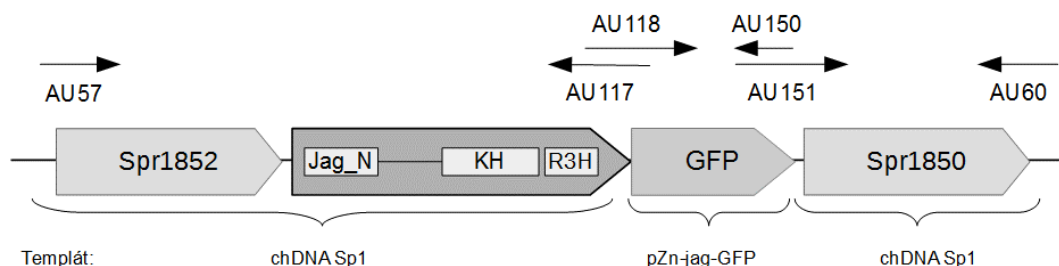
Konstrukty Δ C-terminus *jag*, Δ N-terminus *jag* a Δ R3H *jag* byly transformovány do kmene Sp307 (*jag::janus*). Homologní rekombinací došlo ke včlenění konstruktů do genomu místo Janus kazety a vzniku kmenů Sp315 (*jag* Δ 188-328), Sp316 (*jag* Δ 3-53) a Sp362 (*jag* Δ 268-328). Selektce probíhala ve dvou krocích na krevním agaru. Požadované klony, odolné ke streptomycinu (500 μ g/ml) a citlivé ke kanamycinu (200 μ g/ml), byly ověřeny pomocí koloniové PCR, kdy k amplifikaci docházelo z oligonukleotidů AU57 a AU60 a následnou sekvenací.

5.1.2 Kmeny vytvořené pro stanovení lokalizace proteinu Jag v buňce

Za účelem lokalizace proteinu Jag v buňce byl vytvořen kmen Sp370 (*jag-gfp*), který exprimuje Jag fúzovaný s GFP z nativního promotoru. Konstrukt pro přípravu tohoto kmene vznikl ve třech PCR reakcích. V první reakci byla pomocí oligonukleotidů AU57 a AU117 amplifikována oblast proti směru transkripce genu *jag* a sekvence samotného genu *jag*.

Ve druhé reakci byla amplifikována oblast po směru transkripce genu *jag* z oligonukleotidů AU151 a AU60. Templátem pro tyto dvě reakce byla chDNA Sp1. Třetí reakcí došlo díky AU118 a AU150 k amplifikaci fluorescenční značky *gfp* z konstruktů pZn-jag-GFP (A. Ulrych, nepublikované výsledky). Následující fúzní PCR reakcí byly jednotlivé fragmenty spojeny v konstrukt jag-GFP, který je znázorněn na obrázku 7.

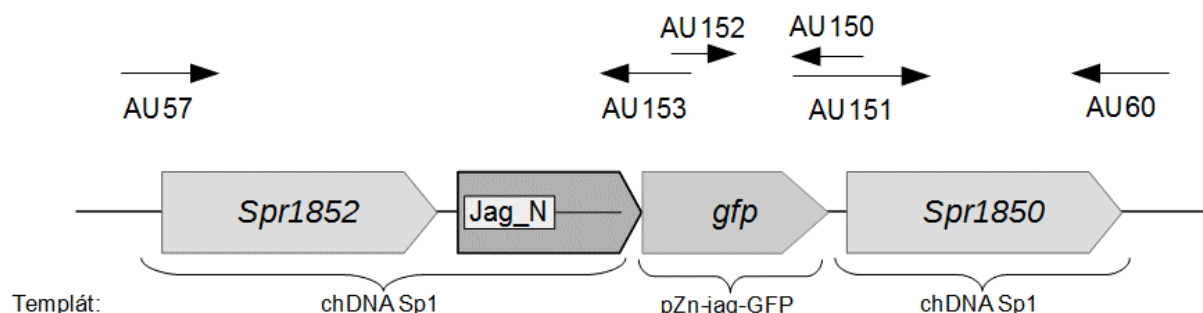
Obrázek 7: Schéma konstruktů jag-GFP



Oblast genu *jag* je znázorněna pětiúhelníkem s černým obrysem, který obsahuje Jag_N, KH a R3H domény s interdoménovou oblastí, kterou představuje středová vodorovná čára. Šipky znázorňují oligonukleotidy použité k amplifikaci. V dolní části je pro každou PCR reakci uvedena templátová DNA.

Pro stanovení lokalizace Jag_N domény v buňce byl připraven kmen Sp371 (*jag-gfp* $\Delta 188-328$), který exprimuje Jag_N doménu a interdoménovou oblast fúzovanou s GFP z nativního promotoru. K přípravě tohoto konstruktů bylo třeba třech PCR reakcí. Během první reakce došlo k amplifikaci oblasti proti směru transkripce *jag* a oblasti Jag_N domény z chDNA Sp1 prostřednictvím oligonukleotidů AU57 a AU153. Oblast GFP byla amplifikována pomocí oligonukleotidů AU150 a AU152 z konstruktů pZn-jag-GFP. Ve třetí reakci byla z chDNA Sp1 amplifikována oblast po proudu transkripce genu *jag* z oligonukleotidů AU151 a AU60. Spojením fragmentů ve fúzní PCR reakci došlo k vytvoření konstruktů jag_N-GFP (viz obrázek 8).

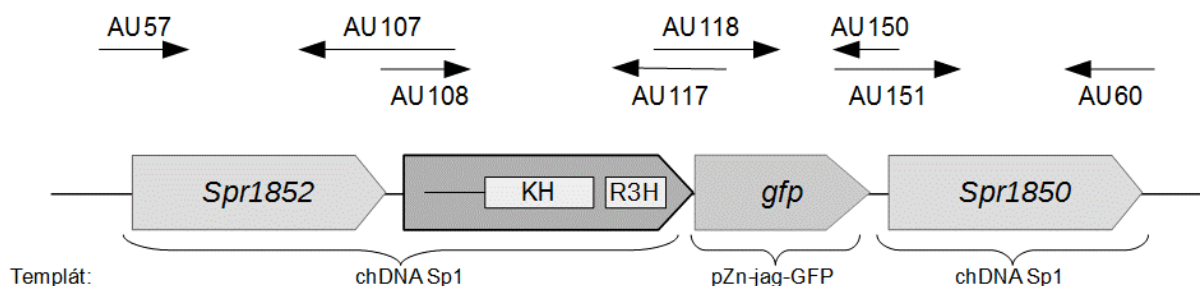
Obrázek 8: Schéma konstruktů *jag_N*-GFP



Oblast genu *jag* je znázorněna pětiúhelníkem s černým obrysem, který obsahuje *Jag_N* doménu a interdoménovou oblast, kterou představuje středová vodorovná čára. Šípky znázorňují oligonukleotidy použité k amplifikaci. V dolní části je pro každou PCR reakci uvedena templátová DNA.

K určení lokalizace C-koncové oblasti proteinu *Jag*, obsahující KH a R3H domény, byl vytvořen kmen Sp372 (*jag-gfp* Δ 3-53), který má odstraněnou *Jag_N* doménu a z nativního promotoru exprimuje C-koncovou část proteinu *Jag* fúzovanou s GFP. Tento konstrukt byl připraven prostřednictvím čtyř PCR reakcí. První PCR reakcí byla pomocí oligonukleotidů AU57 a AU107 amplifikována z chDNA Sp1 oblast proti směru transkripce genu *jag*. Druhou PCR reakcí došlo k amplifikaci interdoménové oblasti společně s C-koncovou oblastí genu *jag*. Oligonukleotidy použité v této reakci byly AU108 a AU117, templátem byla chDNA Sp1. Následně byla z konstruktů pZn-jag-GFP pomocí AU118 a AU150 amplifikována oblast s genem *gfp*. V poslední reakci byla z chDNA Sp1 amplifikována oblast po směru transkripce genu *jag*. Tato amplifikace probíhala prostřednictvím oligonukleotidů AU151 a AU60. Fragmenty AU118/150 a AU151/AU60 byly spojeny ve fúzní PCR ve fragment AU118/AU60. Konečná podoba konstruktů *jag_C*-GFP vznikla fúzní PCR pomocí oligonukleotidů AU57 a AU60, ve které došlo ke spojení fragmentů AU108/AU117, AU118/AU60, AU57/AU107. Konstrukt je znázorněn na následujícím obrázku (obrázek 9).

Obrázek 9: Schéma konstruktů *jag_C-GFP*



Oblast genu *jag* je znázorněna pětiúhelníkem s černým obrysem, který obsahuje KH a R3H domény s interdoménovou oblastí, kterou představuje středová vodorovná čára. Šipky znázorňují oligonukleotidy použité k amplifikaci. V dolní části je pro každou PCR reakci uvedena templátová DNA.

Jednotlivé kmeny vznikly transformací připravených konstruktů do kmene Sp307 (*jag::janus*). Pozitivní klony byly selektovány na krevním agaru a vykazovaly streptomycin rezistentní (500 µg/ml) a kanamycin senzitivní (200 µg/ml) fenotyp. Pozitivní klony byly ověřeny pomocí koloniové PCR reakce a následnou sekvenací.

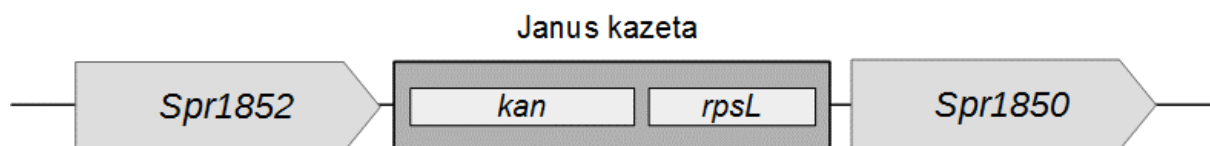
5.1.3 Příprava kmenů určených pro stanovení lokalizace známých proteinů buněčného dělení na pozadí Δjag kmene

Pro lokalizaci pozdního proteinu buněčného dělení DivIVA na pozadí kmene s delecí v genu kódujícím protein Jag byl připraven kmen Sp308 (Δjag *bga::pZn-divIVA-gfp*). Tento kmen exprimuje DivIVA-GFP v závislosti na koncentraci přidaného zinku do média. Příprava tohoto kmene vycházela z využití vektoru pZn-divIVA-gfp izolovaného z kmene Ec144 uchovaného v laboratorním archivu, který nese protein DivIVA fúzovaný s GFP pod zinkem indukovaným promotorem. Vektor štěpený pomocí restriktázy PvuI byl transformován do kmene Sp295 (Δjag) kmene a vzniklý kmen Sp308 (Δjag *bga::pZn-divIVA-gfp*) byl selektován na krevních miskách s tetracyklinem (2,5 µg/ml).

Pro stanovení lokalizace proteinu FtsA v buňce na pozadí kmene s deletovaným genem kódujícím protein Jag byl připraven kmen Sp312 (Δjag *bga::pZn-gfp-ftsA*) u kterého dochází k expresi GFP-FtsA ze zinkem indukovaného promotoru. Vektor pZn-gfp-ftsA izolovaný z kmene laboratorního archivu Ec193 a následně linearizovaný pomocí restriktázy PvuI byl transformován do kompetentních buněk kmene Sp295 (Δjag) a integrován do *bga* lokusu. Transformanti byli selektováni na krevním agaru s tetracyklinem (2,5 µg/ml).

Pro stanovení lokalizace časného proteinu buněčného dělení LocZ na pozadí kmene s delecí *jag* genu byl připraven kmen Sp313 ($\Delta jag::janus\ gfp-locZ$). Delece genu *jag* z kmene Sp233 (*gfp-locZ*), který nese pod nativním promotorem LocZ fúzovaný s GFP, byla zprostředkována pomocí Janus kazety (Ulrych et al., 2016). Janus kazeta (obrázek 10) je sekvence nesoucí geny *rpsL* a *kan*, používaná k delecí genů. Samotný konstrukt vznikl fúzí Janus kazety a oblastí po směru a proti směru transkripce genu *jag* a do genomu se integroval homologní rekombinací. Selektce probíhala dvoustupňově na krevním agaru. Pozitivní transformanti byli rezistentní ke kanamycinu (200 µg/ml) a citliví ke streptomycinu (500 µg/ml).

Obrázek 10: Schematické znázornění Janus Kazety

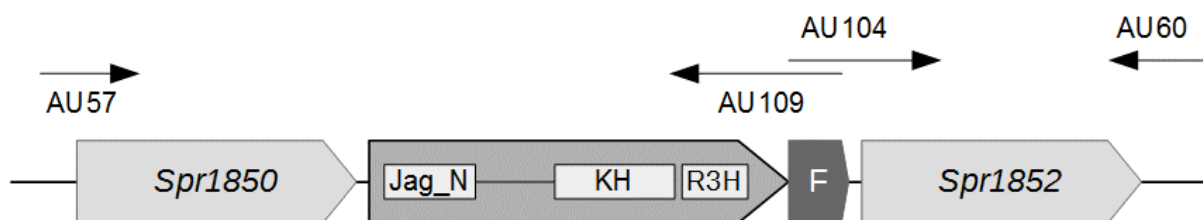


5.1.4 Kmen exprimující Jag-Flag v nativním lokusu (Sp319)

Pro imunodetekci FLAG-epitopu a purifikaci proteinu Jag byl připraven kmen Sp319 (*jag-flag*), který z nativního lokusu exprimuje protein Jag označený FLAG-epitopem. Výchozí kmen Sp307 (*jag::janus*) pro přípravu kmene Sp319, nese v genomu v oblasti *jag* Janus kazetu, která byla homologní rekombinací nahrazena připraveným konstruktem.

Prvním krokem přípravy konstruktů byla PCR amplifikace oblastí genu *jag* a oblastí odpovídající sekvenci před genem *jag* ve směru transkripce pomocí oligonukleotidů AU57 a AU109. Oligonukleotid AU109 nese sekvenci pro FLAG-epitop. Ve druhé PCR reakci došlo k amplifikaci sekvence za genem *jag* ve směru transkripce z oligonukleotidů AU104 a AU60. Oligonukleotid AU104 nese sekvenci komplementární k oligonukleotidu AU109. Fúzní PCR reakcí byly předchozí dva fragmenty spojeny dohromady za použití oligonukleotidů AU57 a AU60. Konstrukt byl nazván Spr1851-Flag (viz obrázek 11).

Obrázek 11: Schéma konstruktů Spr1851-Flag



Oblast genu *jag* je znázorněna pětiúhelníkem s černým obrysem, ve kterém je Jag_N, KH a R3H domény s interdoménovou oblastí, kterou představuje středová vodorovná čára. Sekvence odpovídající FLAG-epitopu je znázorněna tmavě šedým pětiúhelníkem označeným F. Šipky znázorňují oligonukleotidy použité k amplifikaci.

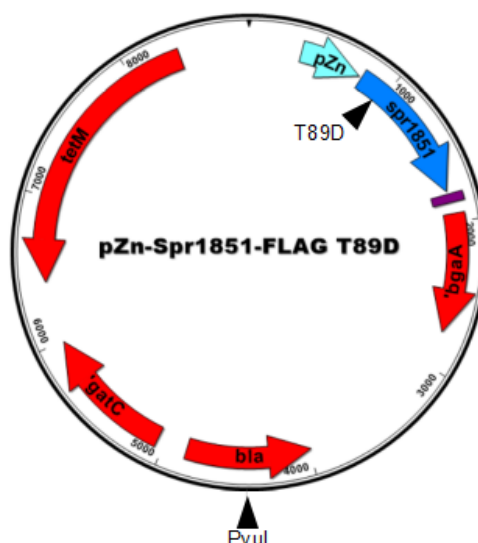
Po transformaci kmene Sp307 připraveným konstruktem následovala integrace konstruktů do genomu pomocí homologní rekombinace. Selektce pozitivních klonů odolných ke streptomycinu (500 µg/ml) a citlivých ke kanamycinu (200 µg/ml) probíhala na krevním agaru.

5.1.5 Příprava kmene se záměnou T89 za kyselinu asparagovou (Sp322)

Pro určení úlohy fosforylace na T89 a pro určení minoritního místa fosforylace proteinu Jag byl vytvořen fosfomimetický kmen Sp322 ($\Delta jag bga::pZn-jag-flag$ T89D). Jag protein v tomto kmeni má T89 zaměněn za D, která nese záporný náboj a napodobuje tak fosforylovaný stav proteinu Jag.

Pro přípravu tohoto kmene byl vytvořen konstrukt pomocí metody cílené mutagenese, která je blíže popsána v kapitole Metody 4.2. Do vektoru pJWV25 nesoucího Jag protein označený FLAG-epitopem, byla místně specifická mutace zavedena tak, že došlo ke změně T89 na D. Po štěpení DpnI restriktázou byl vektor transformován do buněk *E. coli* DH5 α . Selektce pozitivních klonů probíhala na pevném LB médiu. Požadované kmeny byly odolné k ampicilinu (100 µg/ml). Následovala izolace vektoru, amplifikace oblasti *jag* s pomocí oligonukleotidů LN123 a LN143 a sekvenace vybrané části vektoru pro ověření přítomnosti bodové záměny. Kmen byl pojmenován Ec253 (pJWV25-pZn-Spr1851-FLAG T89D). Vektor pJWV25-pZn-Spr1851-FLAG T89D je znázorněn na následujícím obrázku (obrázek 12).

Obrázek 12: Vektor pJWV25-pZn-Spr1851-FLAG T89D



Na obrázku je plazmid pJWV25 ve kterém je světle modrou šipkou znázorněna oblast zinkem indukovaného promotoru, tmavě modrou šipkou oblast *jag* se záměnou T89D, fialový obdélníček představuje oblast FLAG-epitopu. Místo štěpení restriktčního enzymu PvuI představuje černá šipka na obvodu kruhu. Zkratky *bgaA* a *gatC* označují oblasti umožňující včlenění vektoru do postradatelného *bga* lokusu na chDNA pneumokoka. Plazmid dále nese gen pro rezistenci k ampicilinu (*bla*) a gen pro rezistenci k tetracyklinu (*tetM*).

Po ověření bodové záměny v pozici 89 byl vytvořený vektor opět izolován z Ec253, štěpen pomocí restriktázy PvuI a transformován do kmene Sp295 (Δjag). Pozitivní klony byly selektovány na krevním agaru a vykazovaly tetracyklinovou rezistenci (2,5 $\mu g/ml$).

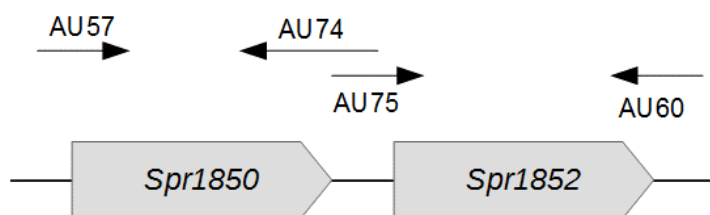
5.1.6 Příprava komplementačního kmene (Sp324) a kmene se záměnou T89 za kyselinu glutamovou (Sp325)

Pro zkoumání role fosforylace na T89 a pro určení minoritního místa fosforylace proteinu Jag byla z kmene Sp304 ($\Delta jag::janus\ bga::pZn-jag-flag$) exprimujícího Jag protein bez aminokyselinové záměny a Sp306 ($\Delta jag::janus\ bga::pZn-jag-flag\ T89E$), který má threonin v pozici 89 zaměněný za kyselinu glutamovou (T89E), odstraněna Janus kazeta. Pro odstranění Janus kazety (popsané v kapitole 4.1.1. Bakteriální kmeny a vektory) z genomů kmenů Sp304 a Sp306, které pocházejí z laboratorního archivu, byl použit konstrukt *jagUp-Down* cassette.

Prvním krokem přípravy konstruktů byla amplifikace oblasti, která odpovídá sekvenci před genem *jag* ve směru transkripce pomocí oligonukleotidů AU57 a AU74. Část oligonukleotidu AU74 je komplementární k oligonukleotidu AU75, který byl společně

s oligonukleotidem AU60 použit k amplifikaci oblasti přilehlé za genem *jag* ve směru transkripce. Jako templát pro obě reakce posloužila chDNA divokého kmene Sp1. Výsledný konstrukt pojmenovaný jako jagUp-Down cassette (viz obrázek 13) vznikl fúzní PCR reakcí probíhající z oligonukleotidů AU57 a AU60, ve které došlo ke spojení obou dříve vytvořených PCR fragmentů díky jejich komplementárním koncovým sekvencím zavedeným pomocí oligonukleotidů AU74 a AU75.

Obrázek 13: Schéma konstruktů jagUp-Down cassette



Na obrázku je schéma konstruktů jagUP-Down cassette. Jednotlivé šipky představují oligonukleotidy, ze kterých probíhaly jednotlivé PCR reakce.

Pozitivní klony byly selektovány na krevním agaru a vykazovaly streptomycin rezistentní (500 µg/ml) a kanamycin senzitivní (200 µg/ml) fenotyp. Delecí Janus kazety z kmene Sp306 vznikl kmen Sp325 (Δjag *bga::pZn-jag-flag* T89E). Kmen Sp304 byl odstraněním Janus kazety změněn v kmen Sp324 (Δjag *bga::pZn-jag-flag*). U všech nově vzniklých kmenů byla delece Janus kazety ověřena koloniovou PCR a následnou sekvenací.

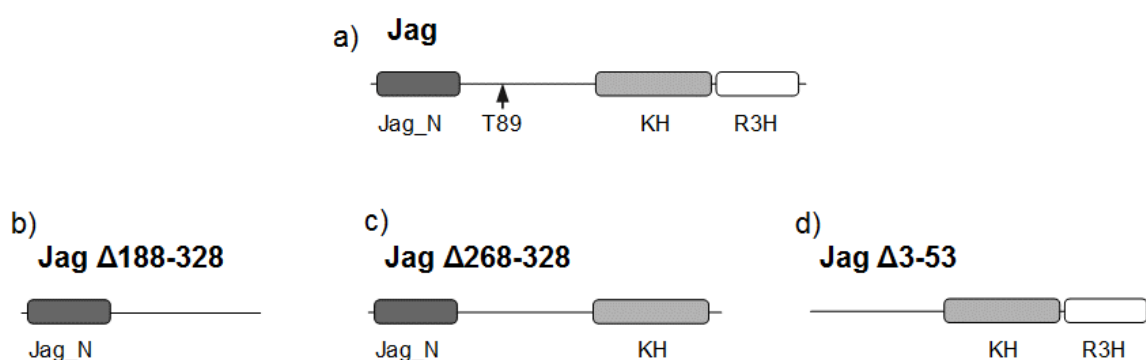
Tabulka 8: Seznam připravených kmenů *S. pneumoniae*

Kmen	Genotyp	Fenotyp	Účel
Sp308	<i>Δjag,bga::pZn-DivIVA-gfp</i>	StrR, KanS, TetR	Lokalizace DivIVA na pozadí kmene s delecí genu <i>jag</i>
Sp312	<i>Δjag bga::pZn-FtsA-gfp</i>	StrR, KanS, TetR	Lokalizace FtsA na pozadí kmene s delecí genu <i>jag</i>
Sp313	<i>Δjag::janus gfp-locZ</i>	StrR, KanS	Lokalizace LocZ na pozadí kmene s delecí genu <i>jag</i>
Sp315	<i>jag Δ188-328</i>	StrR, KanS	Expresce proteinu Jag s deletovanými KH a R3H doménami
Sp316	<i>jag Δ3-53</i>	StrR, KanS	Expresce proteinu Jag s deletovanou Jag_N doménou
Sp319	<i>jag-FLAG</i>	StrR, KanS	Expresce proteinu Jag s FLAG epitopem
Sp322	<i>Δjag bga::pZn-jag-flag T89D</i>	StrR, KanS, TetR	Expresce proteinu Jag s bodovou záměnou T89D pod zinkem indukovaným promotorem na pozadí <i>Δjag</i> kmene
Sp324	<i>Δjag bga::pZn-jag-flag</i>	StrR, KanS, TetR	Expresce proteinu Jag pod zinkem indukovaným promotorem na pozadí <i>Δjag</i> kmene (komplementační kmen)
Sp325	<i>Δjag bga::pZn-jag-flag T89E</i>	StrR, KanS, TetR	Expresce proteinu Jag s bodovou záměnou T89E pod zinkem indukovaným promotorem na pozadí <i>Δjag</i> kmene
Sp362	<i>jag Δ268-328</i>	StrR, KanS	Expresce proteinu Jag s deletovanou R3H doménou
Sp370	<i>jag-gfp</i>	StrR, KanS	Expresce proteinu Jag fúzovaného s GFP
Sp371	<i>jag-gfp Δ188-328</i>	StrR, KanS	Expresce Jag_N domény a interdoménové oblasti fúzované s GFP
Sp372	<i>jag-gfp Δ3-53</i>	StrR, KanS	Expresce interdoménové oblasti, KH a R3H domén fúzovaných s GFP

5.2 Charakterizace fenotypu jag mutantních kmenů

Protein Jag se skládá ze třech domén a interdoménové oblasti obsahující T89, který je hlavním místem fosforylace pomocí StkP kinázy. Pro stanovení funkce jednotlivých domén proteinu Jag byly připraveny následující kmeny (viz obrázek 14): 1) Sp315 (*jag* Δ 188-328) s odstraněnou KH a R3H doménou, 2) Sp316 (*jag* Δ 3-53) postrádající N-koncovou Jag_N doménu a 3) Sp362 (*jag* Δ 268-328), jehož proteinu Jag chybí pouze C-koncová R3H doména.

Obrázek 14: Schematické znázornění zkrácených forem proteinu Jag



Obrázek a) představuje nemutovanou formu proteinu exprimovanou divokým kmenem Sp1. Na obrázku b) je zkrácená forma proteinu exprimovaná kmenem Sp315, zkrácený protein z obrázku c) exprimuje kmen Sp362. Zkrácenou formu zobrazenou pod označením d) exprimuje kmen Sp316.

5.2.1 Ověření exprese a fosforylace zkrácených forem

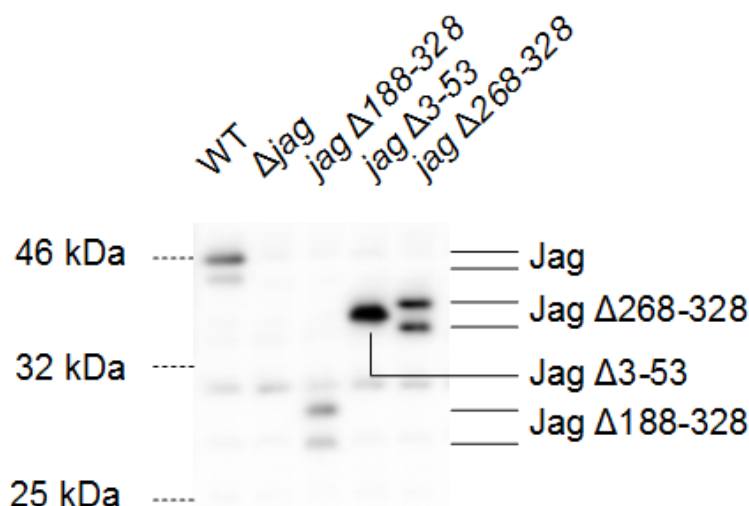
Pro kontrolu exprese a fosforylace zkrácených forem proteinu Jag byly použity buněčné lyzáty kultur pěstovaných v TSB médiu. Proteiny byly rozděleny na 1D SDS-PAGE a přeneseny na PVDF membránu pomocí elektroblotovací soupravy. Následně byla provedena dvoukroková imunodetekce s použitím primárních protilátek anti-P-Thr, anti-Jag a sekundární protilátky anti-rabbit IgG-peroxidáza.

Obrázek 15 znázorňuje imunodetekci s použitím anti-Jag protilátky. Lze z něj vyčíst, že dochází k expresi modifikovaného proteinu u všech vytvořených kmenů. Výsledky imunodetekce naznačují, že hladina exprese se mezi kmeny liší. Hladina exprese u kmene *jag* Δ 188-328 (Sp315) se zdá být nejnižší, zatímco u kmenů *jag* Δ 3-53 (Sp316) a *jag* Δ 268-328 (Sp362) se zdá být vyšší než u divokého kmene.

Na obrázku 16 jsou zachyceny výsledky imunodetekce při použití protilátky proti P-Thr. Levá část obrázku zachycuje kratší čas expozice. Na této imunodetekci nalezneme signál u nemutovaného proteinu divokého kmene (WT) a u kmene *jag* Δ 268-328 (Sp362).

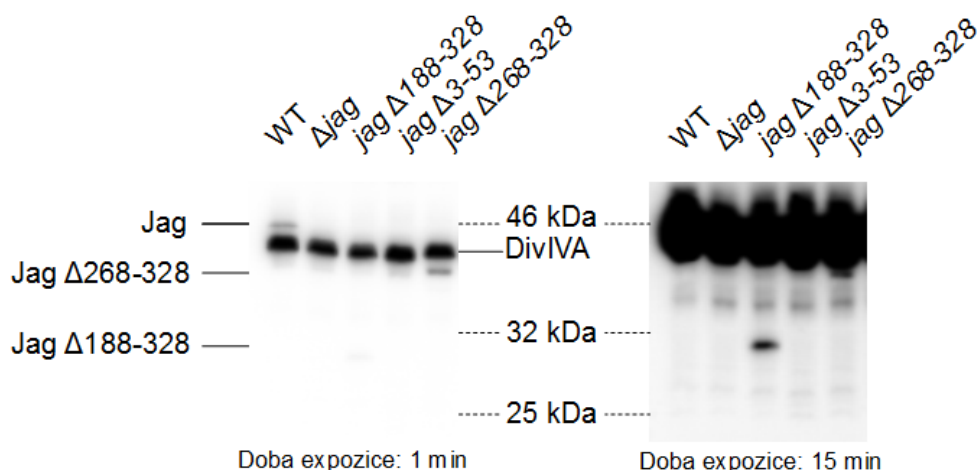
U ostatních mutantních forem není signál patrný. Při zvýšení doby expozice (pravá část obrázku) se u kmene *jag* $\Delta 188-328$ (Sp315) objeví slabý signál, který velikostí odpovídá této zkrácené formě proteinu Jag.

Obrázek 15: Detekce exprese zkrácených forem proteinu Jag



Na obrázku je imunodetekce proteinových lyzátů kmenů WT (Sp1), Δjag (Sp295), *jag* $\Delta 188-328$ (Sp315), *jag* $\Delta 3-53$ (Sp316) a *jag* $\Delta 268-328$ (Sp362). Jako primární protilátka byla použita anti-Jag protilátka v ředění 1:20000.

Obrázek 16: Detekce fosforylace u zkrácených forem proteinu Jag



Na obrázku jsou dvě imunodetekce za použití primární protilátky anti-P-Thr. V levé části obrázku je zachycena imunodetekce s kratší dobou expozice, kde se objevuje u WT kmene signál putující pomaleji než protein DivIVA, který odpovídá nemutované formě proteinu Jag (Ulrych et al., 2016). Dále je zachycen signál odpovídající zkrácené formě proteinu Jag – Jag $\Delta 268-328$, který putuje na gelu rychleji než protein DivIVA. Pravá část odpovídá imunodetekci s delším časem expozice. Při delší expozici se kolem 30kDa objevil další signál odpovídající zkrácené formě proteinu Jag – Jag $\Delta 188-328$. Zkratky kmenů na obrázku: WT - (Sp1), Δjag - (Sp295), *jag* $\Delta 188-328$ - (Sp315), *jag* $\Delta 3-53$ - (Sp316) a *jag* $\Delta 268-328$ - (Sp362).

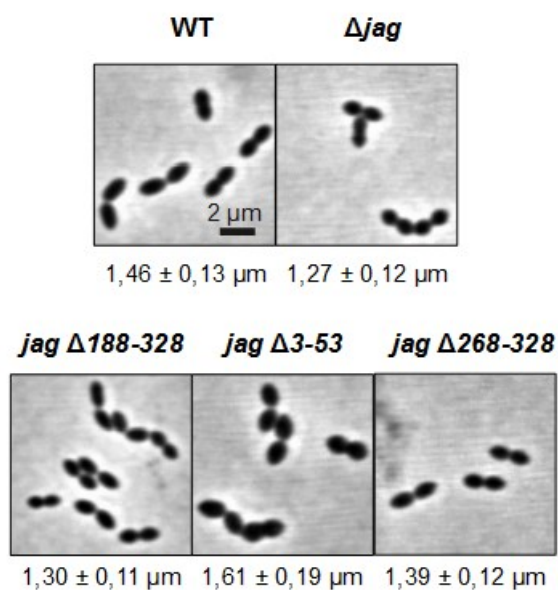
Z experimentů vyplývá, že dochází k expresi všech modifikovaných forem proteinu Jag, přičemž hladina exprese se liší. Kromě nemutované formy proteinu Jag u kmene WT (Sp1) je protein fosforylován nejméně ve dvou zkrácených formách Jag $\Delta 268-328$ (kmen Sp362) a Jag $\Delta 188-322$ (kmen Sp315), přičemž fosforylace třetí formy proteinu - Jag $\Delta 3-53$ (kmen Sp316), byť nebyla detekována, není vyloučena. Případný signál této fosforylace může být překryt silným fosforylačním signálem proteinu DivIVA, který putuje na gelu v blízkosti proteinu Jag.

5.2.2 Morfologická a růstová charakterizace mutantních kmenů nesoucích zkrácené formy proteinu Jag

Jak popsal Ulrych (2016), celková delece proteinu Jag ovlivňuje morfologii buněk. Deleční kmen Sp295 tvoří kratší buňky než divoký kmen a fenotypově připomíná kmen s deletovanou fosfatázou PhpP. Co se růstových charakteristik týká, roste kmen Sp295 pomaleji a dosahuje nižších optických hustot. Tento kmen také vykazuje delší dobu zdvojení oproti divokému kmeni.

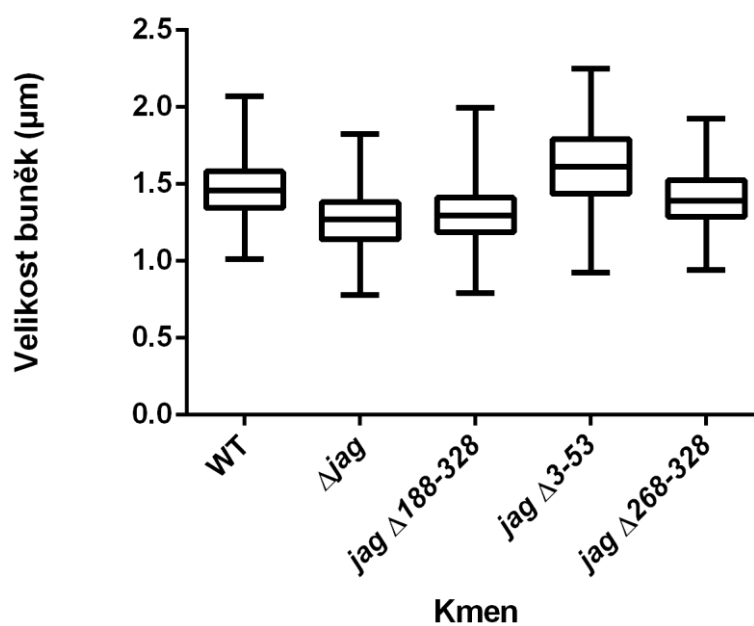
Pro zjištění, která z domén proteinu je zodpovědná za výše popsany fenotyp byly kmeny WT (Sp1), Δjag (Sp295), $jag \Delta 188-328$ (Sp315), $jag \Delta 3-53$ (Sp316) a $jag \Delta 268-328$ (Sp362) kultivovány v TSB médiu. V exponenciální fázi růstu byly ze všech vzorků připraveny mikroskopické preparáty tak, že na sklíčko byly nanесeny 3 μ l kultury a následovala okamžitá mikroskopie. Vzhledem k tomu, že se na první pohled velikosti buněk mezi kmeny lišily (viz obrázek 17), byla u všech kmenů změřena délka buněk pomocí programu MicrobeTrackerSuit. Hodnoty byly analyzovány v programu GraphPad Prism a porovnány s hodnotami pro divoký kmen Sp1 pomocí statistického neparametrického Mann-Whitneyho testu. Graf 1 znázorňuje výsledky této analýzy.

Obrázek 17: Morfologie kmenů exprimujících zkrácené formy proteinu Jag



Snímky znázorňují rozdíly ve velikosti buněk u jednotlivých kmenů. Hodnoty uvedené u jednotlivých snímků představují medián naměřených hodnot se směrodatnou odchylkou.

Graf 1: Velikost buněk kmenů exprimujících zkrácené formy proteinu Jag



Grafické znázornění rozdílů ve velikostech buněk pomocí krabicového grafu. Jednotlivé vodorovné úsečky znázorňují postupně od spodní části grafu: minimum, dolní kvartil, medián, horní kvartil a maximum. Analyzováno bylo 500 buněk od každého kmene.

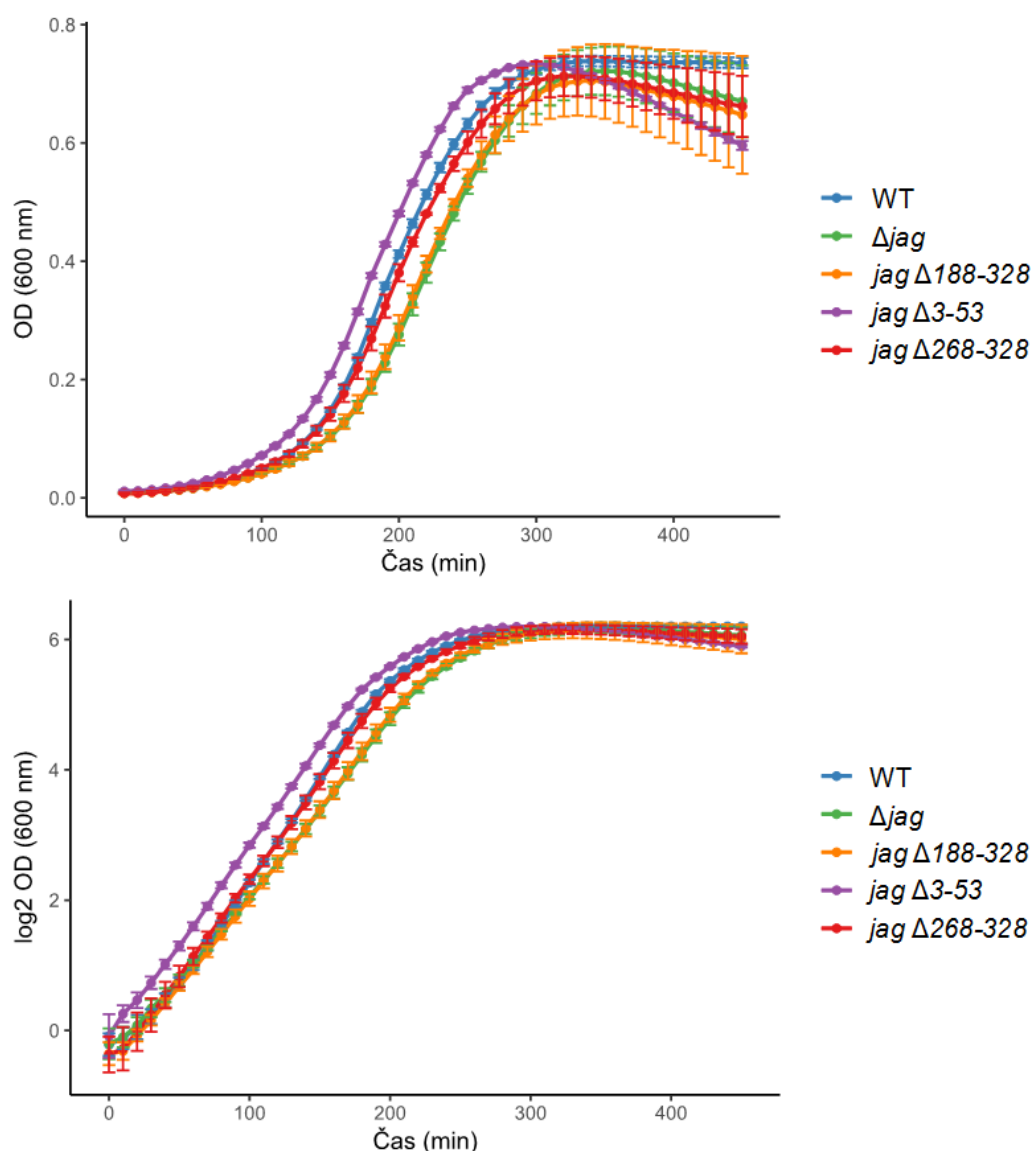
Výsledky potvrzují, že deleční kmen Δjag (Sp295) tvoří statisticky významně kratší buňky ($1,27 \pm 0,12 \mu\text{m}$) než divoký kmen Sp1 ($1,46 \pm 0,13 \mu\text{m}$). Dále je patrné, že fenotypově delečnímu kmeni Δjag (Sp295) odpovídá kmen $jag \Delta 188-328$ (Sp315) ($1,30 \pm 0,11 \mu\text{m}$) s odstraněnými C-koncovými doménami (KH a R3H). Rozdíl mezi délkami buněk kmenů Δjag a $jag \Delta 188-328$ není statisticky významný. Kmen $jag \Delta 268-328$ (Sp362) s odstraněnou R3H doménou se fenotypově více podobá divokému kmeni, ačkoliv také tvoří statisticky významně kratší buňky. Z tohoto pozorování se zdá, že za fenotyp mutantního kmene jsou zodpovědné obě C-koncové domény, přičemž větší vliv má KH doména. Naopak u kmene Sp316 s odstraněnou N-koncovou Jag_N doménou dochází ke statisticky významnému zvětšení buněk oproti divokému kmeni.

K určení růstových vlastností byly kmeny WT (Sp1), Δjag (Sp295), $jag \Delta 188-328$ (Sp315), $jag \Delta 3-53$ (Sp316) a $jag \Delta 268-328$ (Sp362) kultivovány v TSB médiu a růstové křivky byly měřeny pomocí přístroje Evolution™ 201 UV-Visible Spectrophotometer (Thermo Scientific). K měření docházelo automaticky každých 10 minut, kdy byla v průběhu 1 sekundy hodnota OD u každého vzorku měřena pětkrát. Graf 2 znázorňuje průměrné hodnoty ze třech nezávislých experimentů, kdy jednotlivé vzorky byly měřeny v duplikátech. Doby zdvojení jednotlivých kmenů jsou uvedeny v následující tabulce (tabulka 9).

Tabulka 9: Doba zdvojení kmenů exprimujících zkrácené formy proteinu Jag

Kmen	Doba zdvojení
WT (Sp1)	32 min
Δjag (Sp295)	37 min
$jag \Delta 188-328$ (Sp315)	36 min
$jag \Delta 3-53$ (Sp316)	33 min
$jag \Delta 268-328$ (Sp362)	33 min

Graf 2: Růstové křivky kmenů exprimujících zkrácené formy proteinu Jag



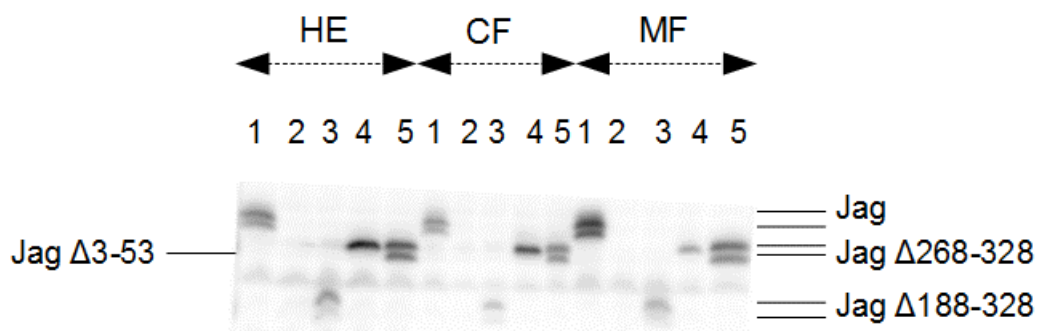
Růstové křivky kmenů WT (Sp1), Δjag (Sp295), $jag \Delta 188-328$ (Sp315), $jag \Delta 3-53$ (Sp316) a $jag \Delta 268-328$ (Sp362) které exprimují zkrácené formy proteinu Jag. Na obrázku a) lze vidět růstové křivky v TSB médiu, obrázek b) znázorňuje semilogaritmické vynesení těchto růstových křivek.

Výsledky poukazují na to, že deleční kmen Δjag (Sp295) roste pomaleji než divoký kmen (Sp1) s delší dobou zdvojení o 5 minut (dobu zdvojení pro WT je 32 minut a pro Δjag 37 minut). Podobné růstové vlastnosti jako Δjag (Sp295) vykazuje kmen $jag \Delta 188-328$ (Sp315), který s delečním kmenem roste téměř shodně a dobu zdvojení má pouze o 1 minutu kratší. Kmeny $jag \Delta 3-53$ (Sp316) a $jag \Delta 268-328$ (Sp362) mají stejnou dobu zdvojení a to 33 minut. Kmen $jag \Delta 268-328$ (Sp362) roste stejně rychle jako WT se stejně dlouhou lag fází. Stejně rychle jako WT roste i kmen $jag \Delta 3-53$ (Sp316), avšak s kratší lag fází.

5.2.3 Asociace zkrácených forem s membránou

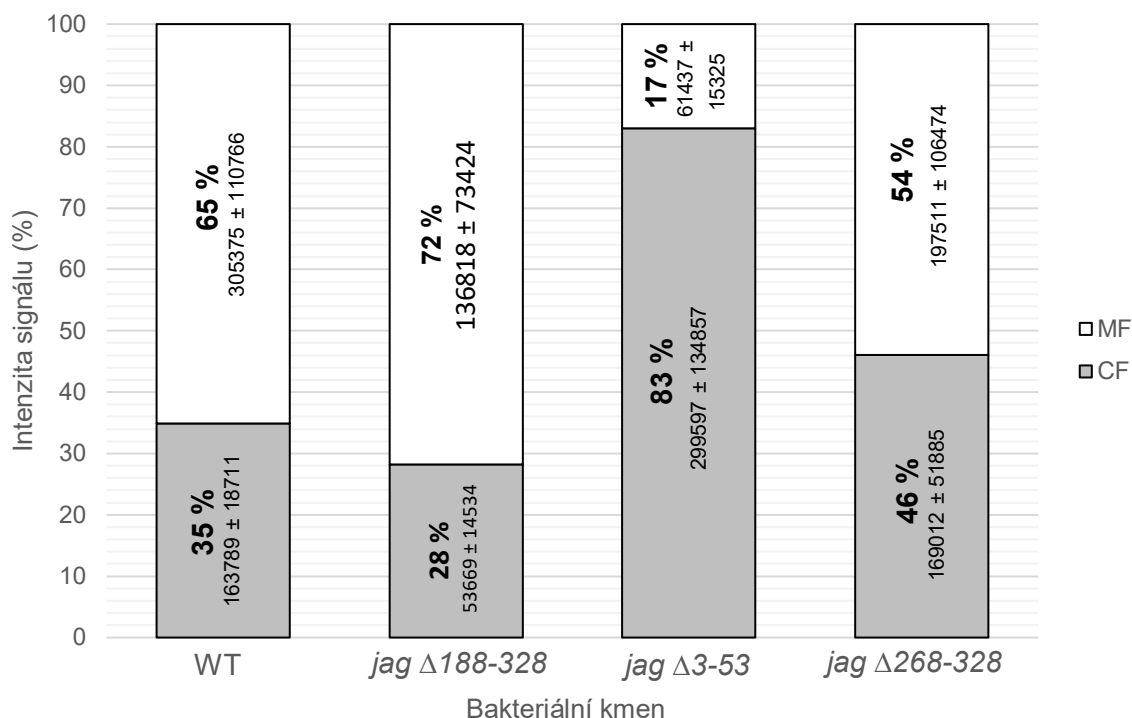
Přestože protein Jag nekóduje ve své sekvenci žádnou predikovanou transmembránovou doménu, byl jako nový substrát kinázy StkP identifikován v membránové frakci (Ulrych et al., 2016). Dalším úkolem tedy bylo určit, která z domén proteinu Jag je zodpovědná za asociaci s membránou. Za tímto účelem od sebe byly odděleny membrány a cytoplazma pomocí centrifugace hrubého proteinového extraktu (HE), díky které byl odebrán supernatant obsahující cytoplazmatickou frakci (CF) a v mikrozkuhavce zůstala peleta obsahující membránovou frakci (MF), která byla rozpuštěna ve stejném objemu, jako byl objem supernatantu. Na 1D SDS-PAGE bylo nanášeno 5 μ l od každého vzorku z každé frakce (HE, CF, MF). Po přenosu proteinů na PVDF membránu následovala imunodetekce pomocí anti-Jag protilátky (obrázek 18). Signál ze třech imunodetekcí byl kvantifikován pomocí programu Quantity One a následně vyhodnocen. Následující graf (graf 3) znázorňuje intenzitu signálu v CF a MF u jednotlivých kmenů exprimujících různě zkrácené formy proteinu Jag.

Obrázek 18: Imunodetekce frakcionace zkrácených forem proteinu jag



Obrázek zachycuje anti-Jag imunodetekci zkrácených forem proteinu Jag v různých frakcích. Vzorky: 1 - WT (Sp1), 2 - Δjag (Sp295), 3 - $jag \Delta 188-328$ (Sp315), 4 - $jag \Delta 3-53$ (Sp316) a 5 - $jag \Delta 268-328$ (Sp362). Zkratka HE značí hrubý extrakt, CF cytoplazmatickou frakci a MF membránovou frakci.

Graf 3: Kvantifikace zastoupení zkrácených forem proteinu Jag v membráně a cytoplazmě



Sloupce představují procentuální zastoupení intenzity signálu proteinu Jag v CF (šedá oblast) a MF (bílá oblast). Hodnoty uvedené pod procentuálním zastoupením vyjadřují průměrné hodnoty intenzity signálu (a. u.) se směrodatnými odchylkami získané ze třech experimentů.

U divokého kmene (Sp1) představuje signál proteinu Jag v CF 35 % a v MF 65 %. Z předkládaných výsledků je patrné, že pokud odstraníme Jag_N koncovou doménu (kmen *jag* Δ3-53 – Sp316), dojde k navýšení intenzity signálu v cytoplazmě o 48 %. K mírnému zvýšení cytoplazmatického signálu na 46 % došlo i u kmene *jag* Δ268-328 (Sp362), který má odstraněnou R3H doménu. Pokud ale odstraníme obě C-koncové domény (KH a R3H), dojde u kmene *jag* Δ188-328 (Sp315) k mírnému zvýšení signálu proteinu Jag v MF. Tyto výsledky naznačují, že v membránové frakci je více zastoupena forma Jag Δ188-328 se zachovanou Jag_N doménou, zatímco v cytoplazmatické části dominuje forma Jag Δ3-53, které Jag_N doména naopak chybí. Lze tedy konstatovat, že za asociaci proteinu Jag s membránou je zodpovědná Jag_N doména.

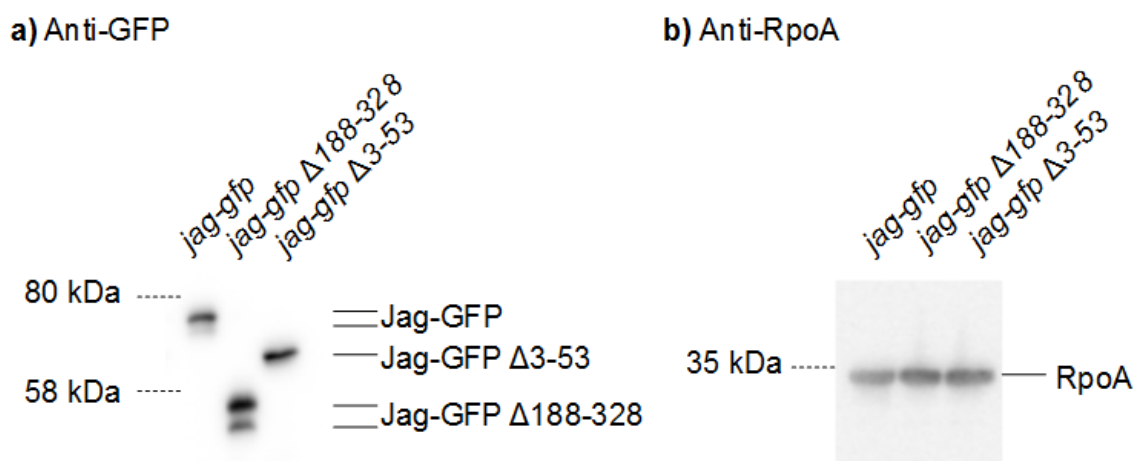
5.2.4 Lokalizace proteinu Jag a jeho zkrácených forem v buňce

Vzhledem k tomu, že Jag byl identifikován v membránové frakci a buňky s delecí genu pro Jag vykazují změny v morfologii je tento protein považován za nový protein buněčného dělení či syntézy buněčné stěny. Vzhledem k tomu, že proteiny buněčného dělení společně s proteiny syntézy buněčné stěny bývají lokalizovány do oblasti septa, bylo dalším úkolem zjistit lokalizaci proteinu Jag a jeho dvou zkrácených forem (Jag $\Delta 188-328$ a Jag $\Delta 268-328$) v průběhu buněčného dělení. Za tímto účelem byly vytvořeny kmeny exprimující protein Jag či jeho části fúzované s GFP z nativního lokusu.

Pro ověření exprese proteinu Jag a jeho zkrácených forem byly připraveny proteinové lyzáty z kmenů *jag-gfp* (Sp370), *jag-gfp* $\Delta 188-328$ (Sp371) a *jag-gfp* $\Delta 3-53$ (Sp372). Následovala detekce izolovaných proteinů pomocí anti-GFP protilátky. Rovnoměrná nanáška proteinů na 1D SDS-PAGE gel byla kontrolována prostřednictvím imunodetekce proteinu RpoA.

Jak je z obrázku 19 patrné, dochází k expresi všech forem proteinu Jag. Všechny formy se exprimují v očekávaných velikostech a z hlediska počtu izoform putují stejně jako zkrácené formy bez GFP. Nanáška byla u všech vzorků shodná.

Obrázek 19: Imunodetekce zkrácených forem proteinu Jag fúzovaných s GFP

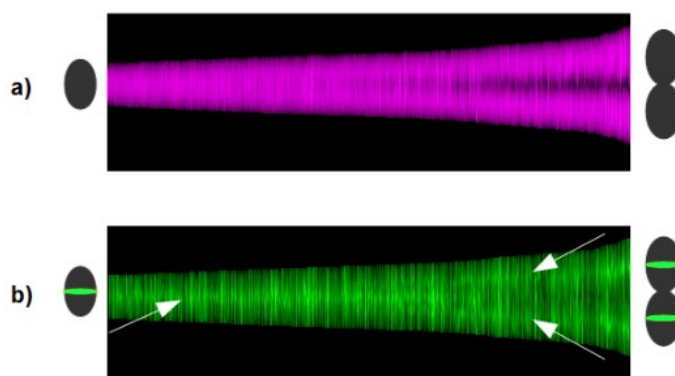


Ověření exprese zkrácených forem proteinu Jag fúzovaných s GFP. V části a) je zobrazena anti-GFP imunodetekce, část b) znázorňuje anti-RpoA imunodetekci. Označení *jag-gfp* odpovídá kmeni Sp370, *jag-gfp* $\Delta 188-328$ označuje kmen Sp371 a *jag-gfp* $\Delta 3-53$ značí kmen Sp372.

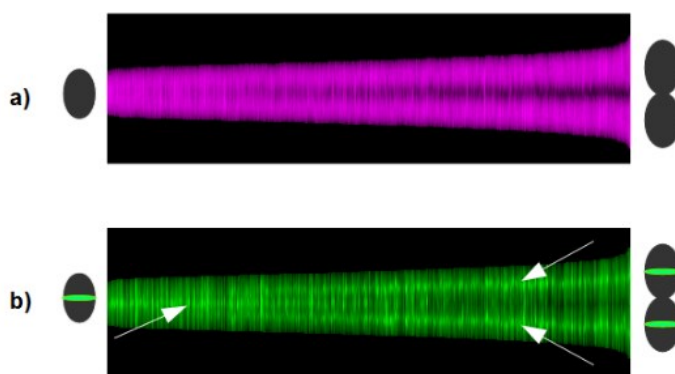
Kmeny *jag-gfp* (Sp370), *jag-gfp* $\Delta 188-328$ (Sp371) a *jag-gfp* $\Delta 3-53$ (Sp372) byly pěstovány v TSB médiu do $OD_{600} = 0,4$. Následně byly připraveny preparáty živých buněk. Mikroskopie probíhala s použitím fluorescenčního filtru pro GFP. Výsledné obrázky vznikly překrytím obrázku pořízeného pomocí GFP filtru a obrázku vzniklého použitím fázového kontrastu. Kvantifikace fluorescenčního signálu byla provedena v programu Object J, který buňky seřadil podle délky, a v každé buňce byla vyhodnocena pozice s největší intenzitou signálu (obrázek 20). Pomocí programu ObjectJ byby buňky podle délky rozděleny do 4 věkových kategorií, kterým odpovídají různá stadia buněčného dělení, v rámci kterých program vyhodnotil intenzitu signálu (viz obrázek 21, 22, 23).

Obrázek 20: Délka buněk a intenzita fluorescence proteinu Jag a jeho zkrácených forem

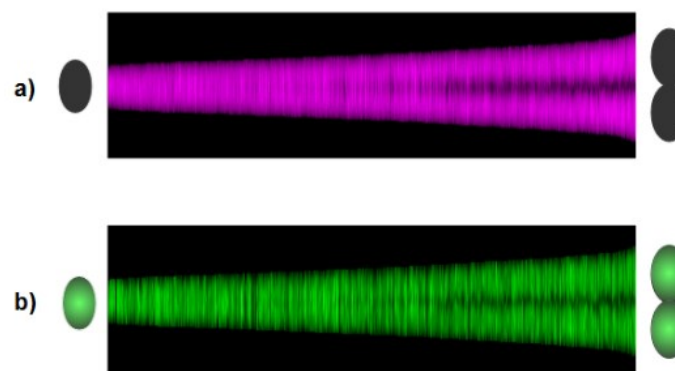
1) Jag-GFP



2) Jag-GFP $\Delta 188-328$

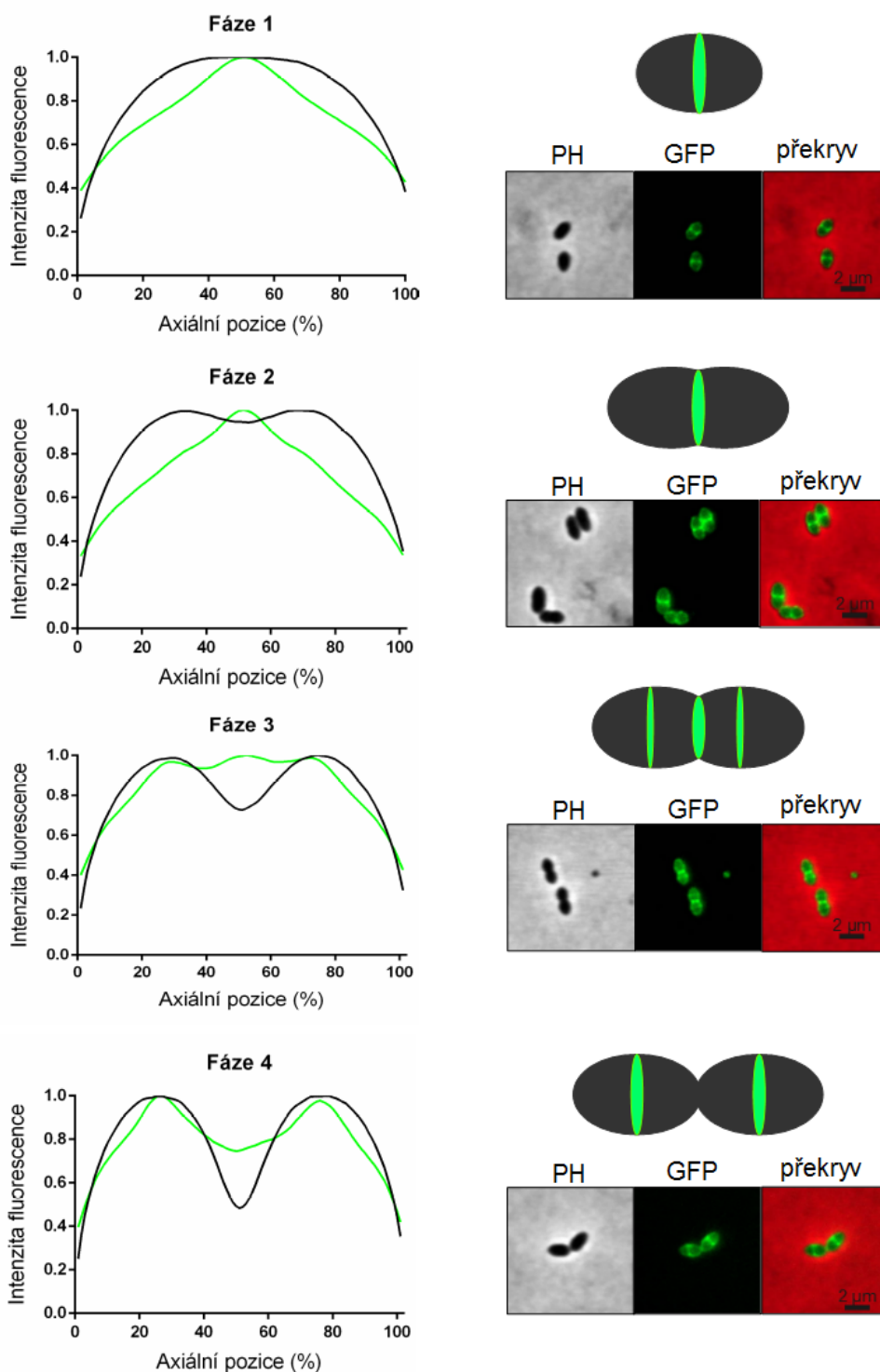


3) Jag-GFP $\Delta 3-53$



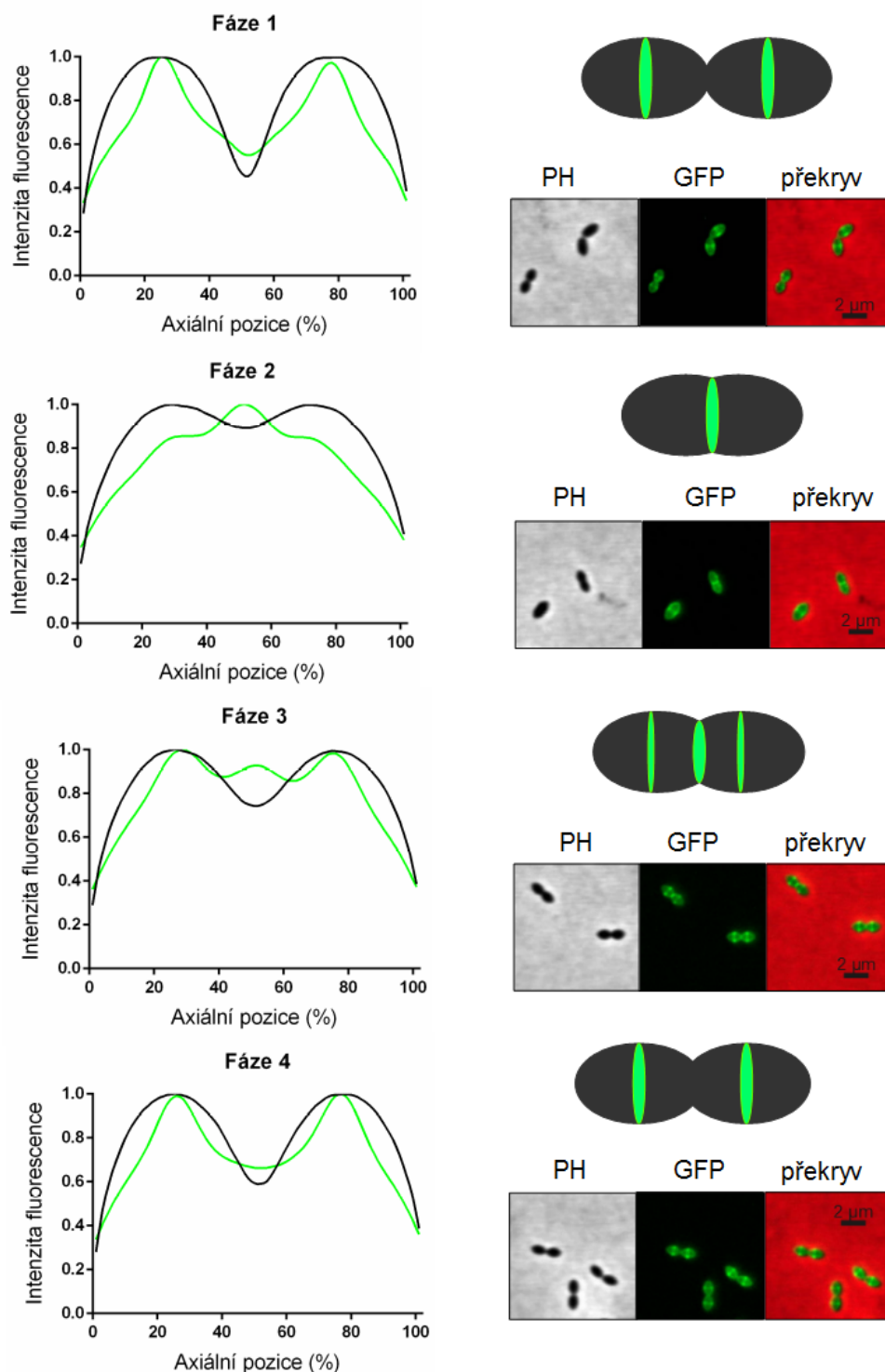
Jednotlivé fialové sloupce o šířce 1 pixelu v grafech označených a) představují jednotlivé buňky a jejich výška odpovídá délce buněk. Buňky jsou seřazené dle délky (nalevo jsou nejkratší buňky) a tmavý pruh představuje vznikající konstrikci u dělicích se delších buněk. V grafech označených b) jsou buňky seřazeny stejným způsobem, přičemž integrovaná intenzita fluorescenčního signálu podél delší osy buňky je znázorněna zeleně. Místa se zvýšenou intenzitou označují bílé šipky. Siluety vedle grafů schematicky znázorňují lokalizaci GFP signálu v buňkách. Pro každý kmen bylo analyzováno 500 buněk.

Obrázek 21: Lokalizace proteinu Jag-GFP



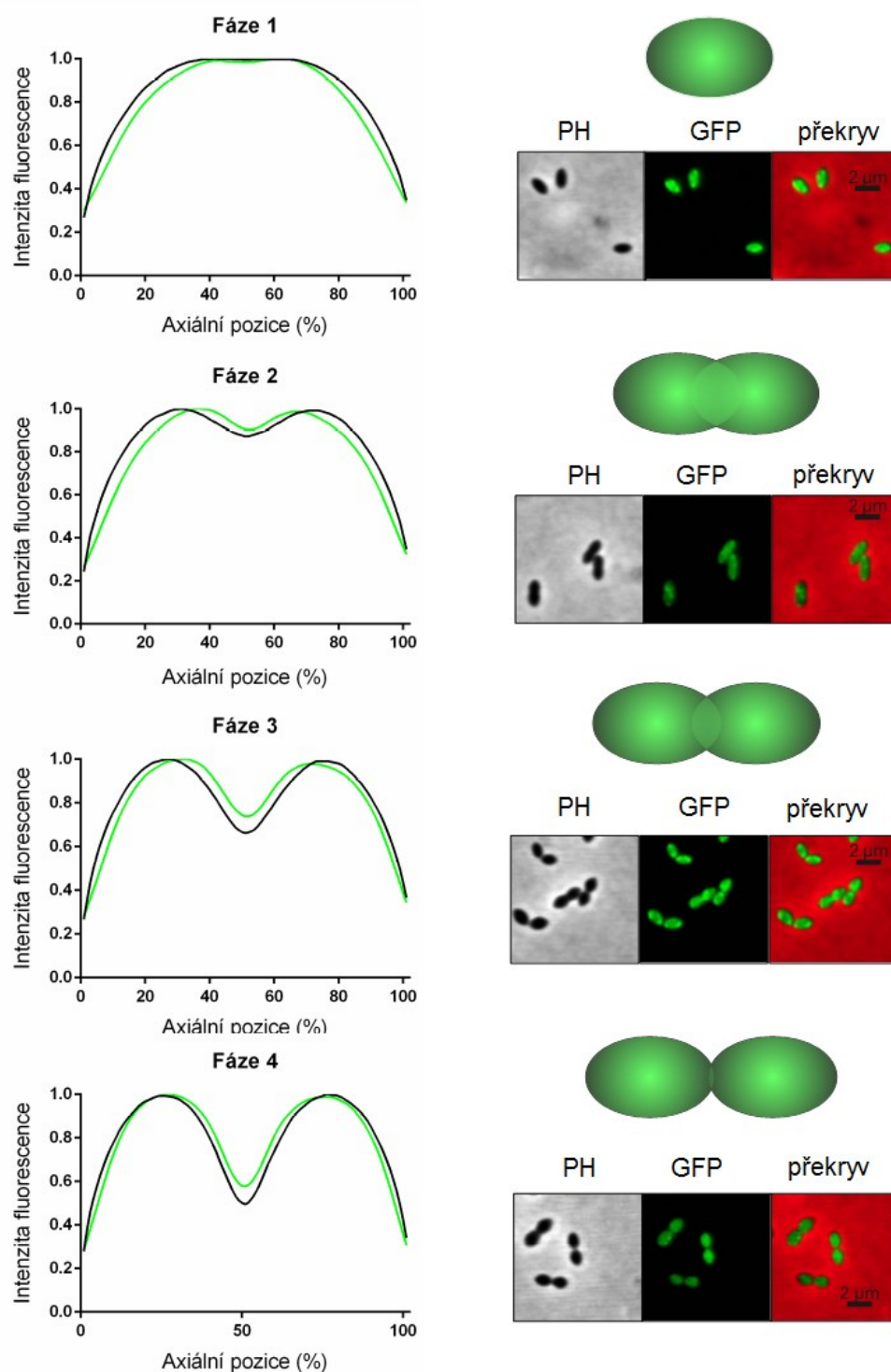
V levé části obrázku jsou grafy vytvořené pro buňky ve 4 fázích růstu, které odpovídají schematickým obrázkům vedle grafů. Na ose x je znázorněna axiální pozice v procentech, což znamená, že rozmezí 0-100 znázorňuje délku buňky a v pozici 50 se nachází její střed. Analyzováno bylo 500 buněk. V pravé části se nachází mikroskopické snímky zachycující jednotlivé fáze růstu buněk a lokalizaci GFP signálu. Zkratky u mikroskopických snímků: PH – fázový kontrast, GFP – GFP filtr, překryv – překryv fázového kontrastu a GFP filtru.

Obrázek 22: Lokalizace proteinu Jag-GFP $\Delta 188-328$



V levé části jsou umístěny grafy znázorňující intenzitu signálu Jag-GFP $\Delta 188-328$ u kmene Sp371 v jednotlivých fázích růstu. Na ose x je znázorněna axiální pozice v procentech, což znamená, že rozmezí 0-100 znázorňuje délku buňky, v pozici 50 se nachází její střed. Analyzováno bylo 500 buněk. V pravé části nalezneme schematické zobrazení buněk v určitých fázích růstu a mikroskopické fotografie odpovídající těmto fázím. Zkratky: PH – fázový kontrast, GFP – GFP filtr, překryv – překryv fázového kontrastu a GFP filtru.

Obrázek 23: Lokalizace proteinu Jag-GFP $\Delta 3-53$ v buňce



V levé části jsou grafy odpovídající jednotlivým věkovým kategoriím, v pravé části nalezneme mikroskopické fotografie a schémata znázorňující lokalizaci GFP signálu pocházejícího z proteinu Jag-GFP $\Delta 3-53$. V grafech je na ose x znázorněna axiální pozice v procentech, což znamená, že rozmezí 0-100 znázorňuje délku buňky, v pozici 50 se nachází její střed. Analyzováno bylo 500 buněk. Zkratky u mikroskopických snímků: PH – fázový kontrast, GFP – GFP filtr, překryv – překryv fázového kontrastu a GFP filtru.

Obrázek 21 znázorňuje lokalizační profil proteinu Jag. V první fázi růstu, kdy *S. pneumoniae* tvoří jednotlivé koky lze pozorovat difuzní cytoplazmatický signál se značným obohacením v oblasti septa. Ke stejné lokalizaci dochází i ve fázi dva, tedy časné fázi buněčného dělení, kdy se začíná tvořit konstriktce ve středu buňky. Ke změně lokalizačního profilu dochází ve fázi 3, kdy se protein Jag začíná přemisťovat do středu nově vznikajících buněk. Ve fázi 4, kdy buňky tvoří diplokoky, signál již ze středu mezi vznikajícími buňkami plně vymizel a je lokalizován do oblasti budoucích sept dceřiných buněk.

Jak je patrné již z obrázku 20, u kmene exprimujícího Jag-GFP $\Delta 188-328$ je menší zastoupení kratších buněk (tj. buněk, které se vyskytují ve formě koků po rozdělení). Tento jev není způsoben tím, že by jich ve vzorku bylo výrazně méně, ale tím, že tento kmen tvoří menší buňky, než zbývající dva kmeny, a tyto buňky mají větší tendenci tvořit řetízky, které není program schopen rozeznat. Proto je na obrázku 22 první fáze znázorněna prostřednictvím dvou téměř oddělených buněk. Porovnáním lokalizačních profilů Jag a Jag $\Delta 188-328$ lze odvodit, že delece C- koncových domén (KH a R3H) nemá vliv na lokalizaci proteinu.

Obrázek 23 znázorňuje lokalizační profil proteinu Jag $\Delta 3-53$ v různých fázích buněčného dělení *S. pneumoniae*. Z obrázků je patrné, že difuzní GFP signál je lokalizován v cytoplazmě bez septálního obohacení a jeho lokalizace se nemění v průběhu dělení buněk.

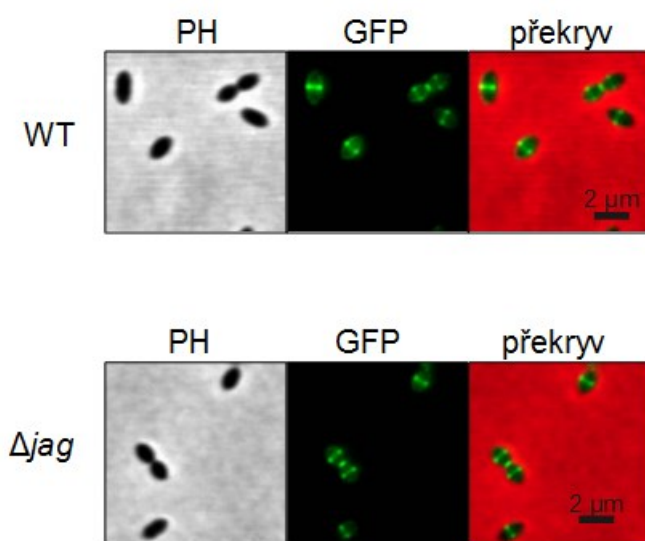
Protein Jag má charakteristický lokalizační profil v průběhu buněčného dělení. Před zahájením a v jeho raných fázích je lokalizován do oblasti septa. V pozdějších fázích dělení se nachází ve středu mezi nově vznikajícími buňkami a v oblasti sept těchto buněk. U nově vzniklých buněk jej nalezneme opět v oblasti septa. Porovnáním lokalizačních profilů Jag a Jag $\Delta 188-328$ lze určit, že delece C- koncových domén (KH a R3H) nemá vliv na lokalizaci proteinu, tudíž je za tuto lokalizaci zodpovědná Jag_N doména. Tento výsledek potvrzuje lokalizační profil proteinu Jag $\Delta 3-53$, kdy po odstranění Jag_N domény dojde ke ztrátě lokalizačního obohacení proteinu v septu a nárůstu difuzního cytoplazmatického signálu.

5.3 Vliv proteinu Jag na syntézu buněčné stěny a na lokalizaci vybraných proteinů buněčného dělení

5.3.1 Vliv proteinu Jag na syntézu buněčné stěny

Protože StkP fosforyluje i substráty podílející se na syntéze buněčné stěny, bylo naším cílem zjistit, zda delece proteinu Jag ovlivní lokalizaci komplexů syntézy buněčné stěny. Za tímto účelem byly kmeny WT (Sp1) a Δjag (Sp295) pěstovány v TSB médiu do dosažení exponenciální fáze. Následně bylo k 1 ml kultury přidáno 0,2 μ l fluorescenčně značeného vankomycinu VAN-FL, který barví místo aktivní syntézy PG, tím, že brání zabudování podjednotek N-acetylglukozaminu a N-acetylmuramové kyseliny do struktury PG. Následovala pětiminutová inkubace při 37 °C. Mikroskopicky za použití fluorescenčního filtru pro GFP jsme zviditelnili místa, ve kterých před přidáním VAN-FL docházelo k aktivní syntéze PG (obrázek 24).

Obrázek 24: Lokalizace syntézy BS u divokého kmene a u kmene Δjag



Mikroskopické snímky pořízené pomocí barvení fluorescenčně značeným vankomycinem VAN-FL znázorňují místa aktivní syntézy PG u divokého kmene WT (Sp1) a kmene delečního Δjag (Sp295).

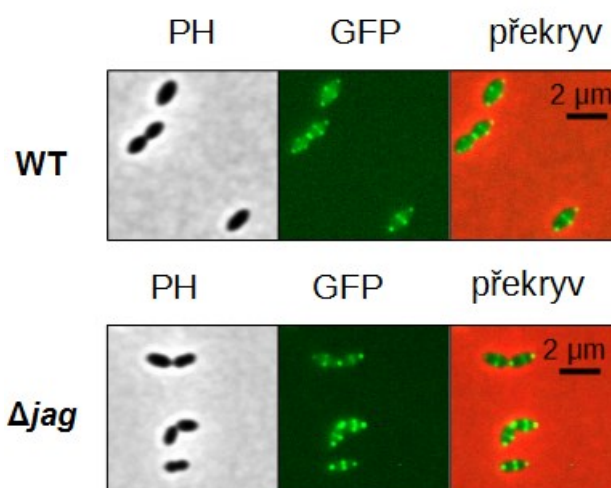
Porovnání lokalizačního profilu míst syntézy PG u divokého kmene WT (Sp1) a u delečního kmene Δjag (Sp295) ukázalo, že protein Jag nemá vliv na lokalizaci komplexů syntézy buněčné stěny.

5.3.2 Vliv proteinu Jag na lokalizaci vybraných proteinů buněčného dělení

Pro zjištění, zda má protein Jag vliv na lokalizaci vybraných časných a pozdních proteinů buněčného dělení (DivIVA, FtsA a LocZ) byly porovnány lokalizační profily u kmenů bez delece a s delecí genu *jag*. Kmeny exprimující protein DivIVA fúzovaný s GFP (Sp70 - *bga::pZn-divIVA-gfp* a Sp308 - Δjag *bga::pZn-divIVA-gfp*) a protein FtsA fúzovaný s GFP (Sp157 - *bga::pZn-gfp-ftsA* a Sp312 - Δjag *bga::pZn-gfp-ftsA*) pod kontrolou inducibilního promotoru v *bga* lokusu byly pěstovány v C+Y médiu v přítomnosti induktoru exprese (0,45 mM ZnSO₄). Kmeny exprimující protein LocZ fúzovaný s GFP z nativního lokusu (Sp233 - *gfp-locZ* a Sp313 - $\Delta jag::janus$ *gfp-locZ*) byly pěstovány v témže médiu bez induktoru. Po dosažení exponenciální fáze růstu, byly připraveny mikroskopické preparáty. Mikroskopie probíhala za použití GFP filtru a fázového kontrastu.

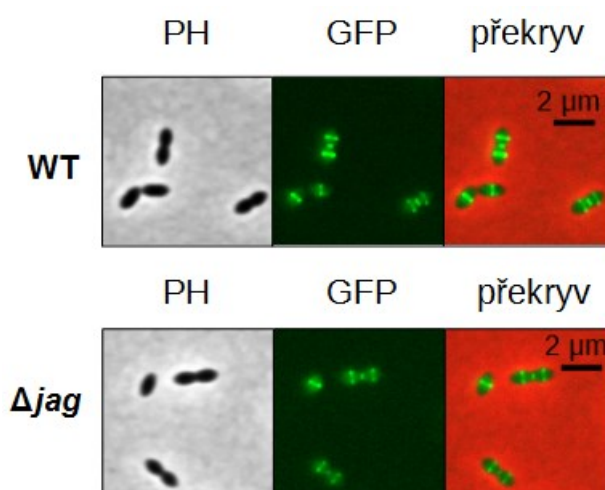
Jak obrázek 25 napovídá, protein DivIVA je lokalizován do oblasti septa a na pólech buněk. Jeho správná lokalizace však není závislá na přítomnosti proteinu Jag. Obdobný výsledek můžeme vidět i na obrázku 26, kdy FtsA po delecí proteinu Jag zůstává lokalizován v oblasti septa. Podobně je tomu i u proteinu LocZ (viz obrázek 27), který po odstranění proteinu Jag nemění svoji lokalizaci. Z výsledků je patrné, že protein Jag nemá vliv na lokalizaci časných (LocZ, FtsA) ani pozdních (DivIVA) proteinů buněčného dělení.

Obrázek 25: Lokalizace proteinu DivIVA



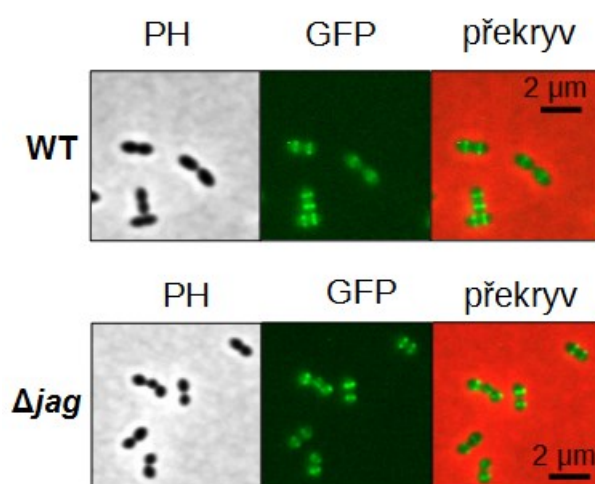
Lokalizační profil pozdního proteinu buněčného dělení DivIVA, v závislosti na přítomnosti proteinu Jag. WT označuje kmen Sp70 (*bga::pZn-divIVA-gfp*) a Δjag značí kmen Sp308 (Δjag *bga::pZn-divIVA-gfp*). PH – snímek vytvořený v režimu fázového kontrastu, GFP – snímek vytvořený s použitím GFP filtru, překryv – snímek vzniklý překryvem dvou předcházejících.

Obrázek 26: Lokalizace proteinu FtsA



Snímky znázorňují lokalizaci proteinu FtsA u buněk exprimujících protein Jag a u kmene delečního. WT značí kmen Sp157 (*bga::pZn-gfp-ftsA*) a Δjag kmen Sp312 (Δjag *bga::pZn-gfp-ftsA*). PH – snímek vytvořený v režimu fázového kontrastu, GFP – snímek vytvořený s použitím GFP filtru, překryv – snímek vzniklý překryvem dvou předcházejících.

Obrázek 27: Lokalizace proteinu LocZ



Na obrázku jsou snímky znázorňující lokalizaci proteinu buněčného dělení LocZ v závislosti na přítomnosti proteinu Jag. WT - kmen Sp233 (*gfp-locZ*) a Δjag – kmen Sp313 ($\Delta jag::janus$ *gfp-locZ*). PH – snímek vytvořený v režimu fázového kontrastu, GFP – snímek vytvořený s použitím GFP filtru, překryv – snímek vzniklý překryvem dvou předcházejících.

5.4 Stanovení role fosforylace na T89

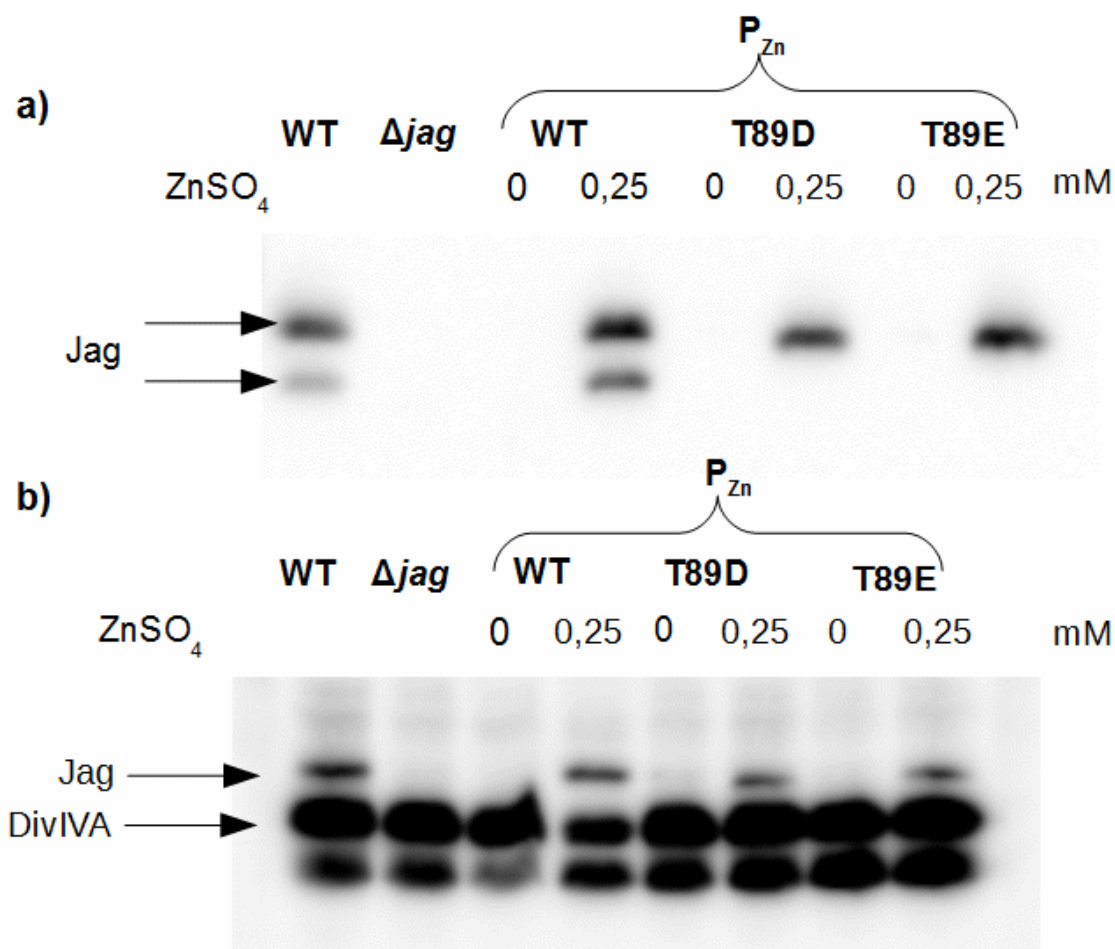
Fosforylace je jedním z nejdůležitějších mechanismů přenosu signálu z prostředí do buněk či přenosu signálu intracelulárního. Protein Jag je majoritně fosforylován na T89 a navíc obsahuje dosud neurčené místo minoritní fosforylace. K určení role fosforylace T89 a k identifikaci minoritního místa fosforylace byly připraveny kmeny nesoucí fosfomimetické mutace. Kmen Sp322 nese na pozici T89 kyselinu asparagovou (T89D) a kmen Sp325 má na stejné pozici kyselinu glutamovou (T89E). Dále byl připraven kmen komplementační Sp324. Všechny tyto kmeny mají gen pro Jag deletovaný z nativního lokusu a exprimují jej z *bga* lokusu ze zinkem indukovaného promotoru.

5.4.1 Ověření exprese a fosforylace mutovaných proteinů pomocí imunodetekce

K ověření exprese mutovaných forem proteinu Jag a fosforylace na T89 byly použity následující kmeny: Sp324 (Δjag *bga::pZn-jag-flag*), Sp322 (Δjag *bga::pZn-jag-flag* T89D) a Sp325 (Δjag *bga::pZn-jag-flag* T89E). Tyto kmeny byly pěstovány v C+Y médiu s přidaným induktorem a bez něj. Jako kmeny kontrolní byly použity Sp1 (WT) a Sp295 (Δjag). V celkových lyzátech byla detekována exprese proteinu Jag pomocí anti-Jag protilátky a fosforylace pomocí anti-P-Thr protilátky.

Na obrázku 28a) je znázorněna detekce proteinu Jag pomocí anti-Jag protilátky v lyzátech kmenů Sp1 (WT), Sp295 (Δjag), Sp324 (P_{Zn}WT), Sp322 (T89D) a Sp325 (T89E) v závislosti na přítomnosti induktoru exprese. U divokého kmene, stejně jako u kmene komplementačního (Sp324 - P_{Zn}WT), Jag putuje ve dvou izoformách, zatím co u kmenů s fosfomimetickými záměnami izoforma s vyšší molekulovou hmotností mizí a druhá forma je zachována se změnou pohyblivosti na gelu. Obrázek 28b) ukazuje fosforylaci proteinu Jag u výše zmíněných kmenů. Obrázek naznačuje, že fosforylace u mutovaných forem proteinu Jag je nižší oproti divokému typu.

Obrázek 28: Detekce exprese a fosforylace mutovaných forem proteinu Jag



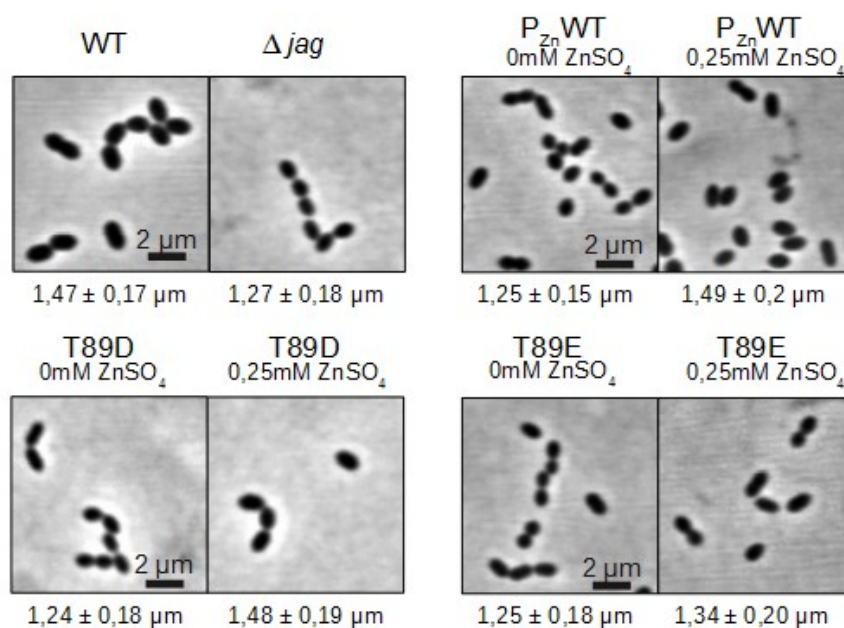
Obrázek a): Ověření indukce exprese proteinu Jag z indukibilního zinkového promotorů u kmenů P_{Zn} WT (Sp324), T89D (Sp322) a T89E (Sp325). Jako pozitivní kontrola byl použit kmen WT (Sp1) a jako negativní kmen Δjag (Sp295). Obrázek b): Ověření fosforylace u výše zmíněných kmenů.

5.4.2 Stanovení morfologie a velikosti buněk fosfomimetických kmenů

Delece proteinu Jag má za následek statisticky významné zkrácení buněk (Ulrych et al., 2016). Abychom odlišili, zda je tento efekt způsobený delecí genu pro Jag či pouze ztrátou majoritního místa fosforylace T89, byly kmeny Sp1 (WT), Sp295 (Δjag), Sp324 (P_{Zn} WT), Sp322 (T89D) a Sp325 (T89E) pěstovány v C+Y médiu s přidavkem a bez přidavku induktoru ($ZnSO_4$ o koncentraci 0,25 mM Zn^{2+} iontů). Morfologie těchto kmenů byla pozorována pomocí světelné mikroskopie za použití fázového kontrastu. Následně byly buňky měřeny prostřednictvím programu MicrobeTrackerSuit. Získaná data byla dále analyzována a zpracována v programu GraphPad Prism. Z obrázku 29 a grafu 4 je patrné, že všechny kmeny, u nichž nedocházelo k indukci exprese, tvořily buňky velikostně podobné delečnímu

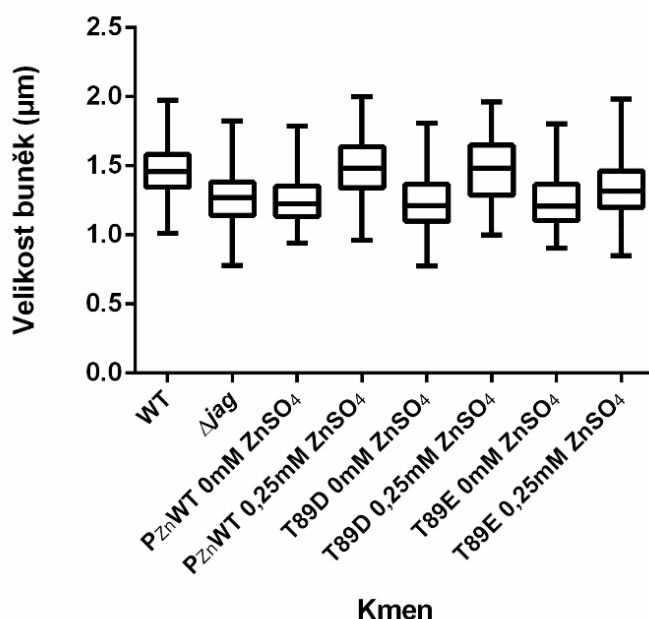
kmeni Sp295 (Δjag). Po přidavku $ZnSO_4$ do média docházelo při koncentraci 0,25 mM $ZnSO_4$ ke komplementaci velikosti buněk u komplementačního kmene Sp324 ($P_{Zn}WT$) a u kmene Sp322 se záměnou T89D. Komplementační fenotyp kmene Sp325 se záměnou T89E se částečně projevil při koncentraci 0,25 mM $ZnSO_4$ (obrázek 29, graf 4), ovšem úplné komplementace dosáhl při koncentraci 0,3 mM $ZnSO_4$ (data nejsou prezentována).

Obrázek 29: Mikroskopické snímky kmenů Sp324, Sp322 a Sp325 bez indukce a s indukcí exprese proteinu Jag



Mikroskopické snímky znázorňující rozdíly ve velikosti buněk kmenů WT (Sp1), Δjag (Sp295), $P_{Zn}WT$ (Sp324), T89D (Sp322) a T89E (Sp325) bez indukce exprese proteinu Jag a s jeho indukcí po přidání 0,25 mM $ZnSO_4$. Hodnoty uvedené u jednotlivých snímků představují medián naměřených hodnot se směrodatnou odchylkou.

Graf 4: Délka buněk kmenů Sp324, Sp322 a Sp325 bez indukce a s indukcí exprese proteinu Jag



Grafické znázornění analýzy velikosti buněk kmenů WT (Sp1), Δjag (Sp295), $P_{Zn}WT$ (Sp324), T89D (Sp322) a T89E (Sp325) bez indukce exprese proteinu Jag a s jeho indukcí po přidání 0,25 mM $ZnSO_4$. Jednotlivé vodorovné úsečky krabicových grafů znázorňují postupně od spodní části grafu: minimum, dolní kvartil, medián, horní kvartil a maximum. N = 350 buněk.

Na základě předkládaných výsledků lze říci, že mutované proteiny jsou exprimovány pouze v závislosti na přítomnosti induktoru. Buňky bakteriálního kmene Sp324 ($P_{Zn}WT$) komplementují fenotyp divokého kmene při koncentraci 0,25 $ZnSO_4$. Kmeny obsahující záměnu T89 za kyselinu asparagovou (Sp322 - T89D) či glutamovou (Sp325 - T89E) nevykazují výrazné odlišnosti od morfologie kmene komplementačního Sp324 ($P_{Zn}WT$), ale jejich modifikované proteiny se liší pohyblivostí na gelu. Obdobné výsledky byly publikovány pro záměnu T89 za alanin (Ulrych et al., 2016), což naznačuje, že role fosforylace proteinu Jag na threoninu v pozici 89 nemá významný vliv na morfologii buněk.

6 Diskuze

Díky tomu, že *S. pneumoniae* kóduje jedinou serin/threoninovou kinázu eukaryotického typu a k ní příslušnou fosfatázu, představuje vhodný modelový organizmus pro studium signalizační dráhy regulované StkP kinázou a PhpP fosfatázou. Protein Jag je spolu s proteiny buněčného dělení, jako je například DivIVA (Nováková et al., 2010) či FtsA (Beilharz et al., 2012), a proteiny syntézy buněčné stěny, ke kterým patří enzym GlmM (Nováková et al., 2005) nebo MurC (Falk a Weisblum, 2013), substrátem této kinázy.

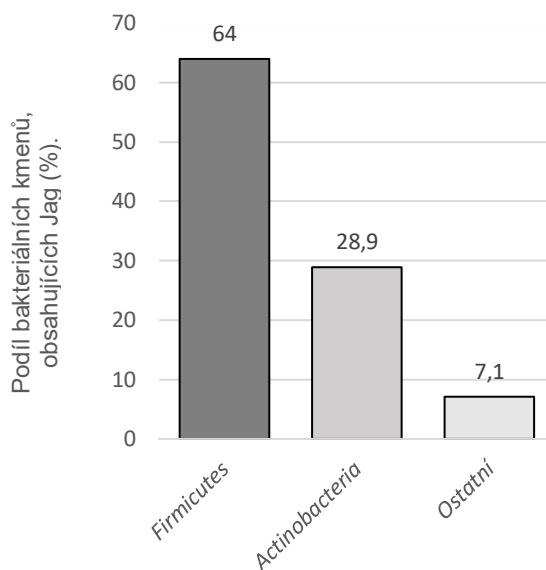
Protein Jag *S. pneumoniae* je homologní k proteinu Jag *B. subtilis* a skládá se ze třech predikovaných domén - Jag_N, KH, R3H a interdoménové oblasti obsahující T89, který je hlavním místem fosforylace prostřednictvím StkP kinázy. Funkce Jag_N domény není známa, zatímco KH a R3H domény se schopností vázat nukleové kyseliny jsou konzervované u širokého spektra organismů. Složení domén proteinu Jag a k němu homologních proteinů napovídá, že se jedná o RNA vazebné proteiny, přesto však zůstává jejich funkce neznáma.

Poprvé byla KH doména, dlouhá přibližně 70 aminokyselin, identifikována v lidském heterogenním jaderném ribonukleoproteinu K (hnRNP K) (Siomi et al., 1993). Podle struktury lze KH motiv rozdělit na dvě skupiny: typ I se nachází v eukaryotických proteinech a od typu II, zastoupeného u prokaryot, se liší zastoupením alfa helixů a beta listů na koncích proteinu (Grishin, 2001). U obou těchto skupin se nachází konzervovaný motiv obsahující sekvenci GXXG (glycin – nesespecifická aminokyselina – nesespecifická aminokyselina – glycin). KH domény často bývají v proteinech zastoupeny ve více kopiích, příkladem může být lidský fragilní X protein (FMRP), který obsahuje dvě kopie KH domény nebo hnRNP K, který obsahuje kopie tři (CDD). Příkladem bakteriálního proteinu obsahujícího dvě KH domény je protein NusA *E. coli*, který interakcí s RNA polymerázou (Gill et al., 1991) a vazbou na vznikající jednovláknovou RNA (Gusarov a Nudler, 2001; Liu a Hanna, 1995) ovlivňuje terminaci a antiterminaci transkripce. Bylo také prokázáno, že pro aktivitu tohoto proteinu je zásadní právě konzervovaná sekvence GXXG, a že změny v KH doménách ovlivňují vazbu proteinu na RNA (Zhou et al., 2002). Výjimkou však nejsou ani proteiny, které obsahují pouze jednu KH doménu. Příkladem může být lidský protein Sam68 či bakteriální protein S3, který je součástí 30S ribozomální podjednotky. Tento protein hraje roli v regulaci helikázové aktivity ribozomu (Takayar et al., 2005) a interaguje jak s rRNA (Urlaub et al., 1995) tak i se vznikajícím peptidem (Choi et al., 1998).

R3H doména je zastoupena v širokém spektru proteinů u různých organismů. Sekvence, které obsahují R3H doménu se dělí podle podobností okolí R3H domény do několika skupin. Bakteriální proteiny homologní k proteinu Jag *B. subtilis* obsahují KH doménu, která sousedí s N-koncem R3H domény. Zastoupení těchto proteinů u bakterií je popsáno v následujícím odstavci. Další tři rodiny proteinů mají v okolí R3H domény umístěnou ATPázovou doménu, a liší se tím, zda je tato doména umístěna po směru či proti směru transkripce. Tyto skupiny proteinů mohou obsahovat další helikázové či ATPázové domény a nalezneme je mimo jiné u lidí, myši (např. *Mus musculus*) a rostlin (např. *Arabidopsis thaliana*). Další proteiny s R3H doménou obsahují šest opakování bohatých na cystein a kruhový typ motivu zinkového prstu proti směru transkripce R3H domény. Tyto proteiny lze najít například u lidí, u zástupce dvoukřídých *Drosophila melanogaster* a u kvasinky *S. cerevisiae* (shrnutí v přehledovém článku Grishin, 1998).

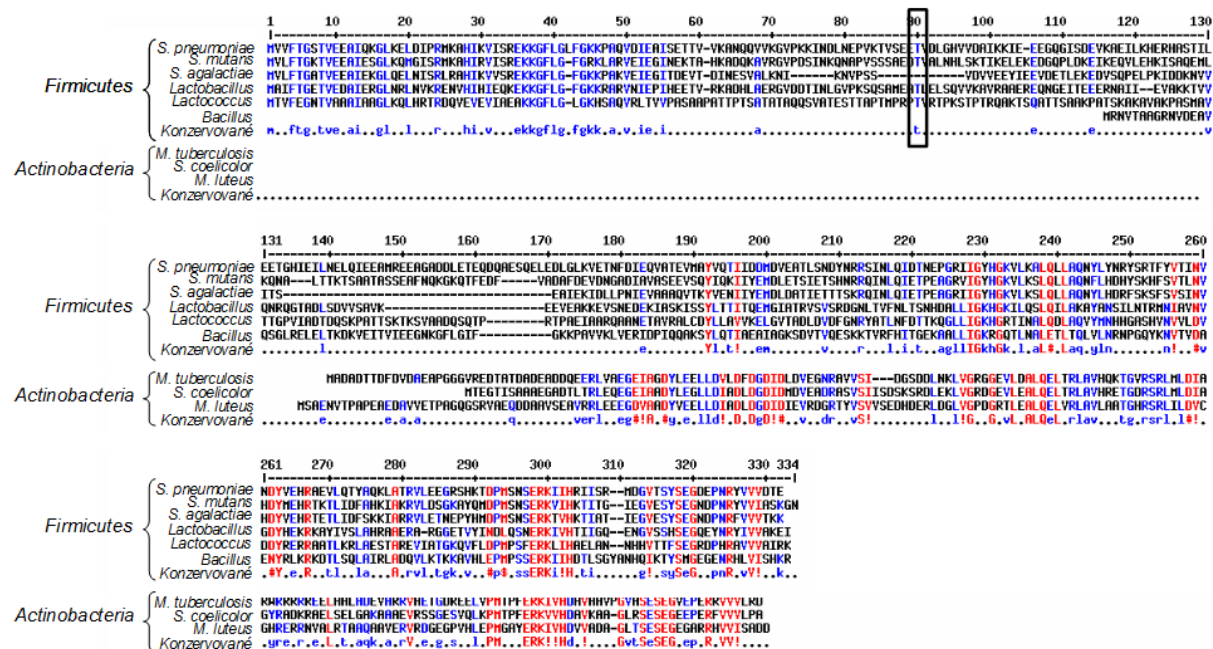
Homology proteinu Jag nalezneme zejména u bakterií, které patří do kmene *Firmicutes* a *Actinobacteria* (viz graf 5). Protein Jag není konzervovaný u archebakterií ani eukaryot, ačkoliv v jejich proteinech nalzneme domény, které tento protein obsahuje. Jak je z obrázku 30 patrné, k vysoce konzervovaným oblastem proteinu Jag u kmene *Firmicutes* patří N-koncová část proteinu spolu s oblastí C-koncovou. V těchto částech jsou lokalizovány jednotlivé domény. U této skupiny je konzervovaný i T89. Do kmene *Firmicutes* patří i *B. subtilis*, u kterého byl protein Jag popsán, jak je ale patrné z jeho sekvence, je tento protein u *B. subtilis* kratší asi o 120 aminokyselin, než u ostatních vybraných bakterií náležících do tohoto kmene. Tento fakt může souviset s tím, že tato bakterie, jako jediná z uvedených z kmene *Firmicutes*, tvoří spory a připomíná tak homology proteinu Jag u kmene *Actinobacteria*. Homology proteinu Jag u této skupiny jsou přibližně o 140 aminokyselin kratší a neobsahují N-koncovou konzervovanou oblast, zatímco C-koncová konzervovaná oblast zůstává zachována.

Graf 5: Podíl zastoupení proteinu Jag u bakterií



Graf zobrazuje podíl zastoupení proteinu Jag u bakterií. Nejvíce je protein zastoupen u kmene *Firmicutes*. Mezi nejčastěji zastoupené kmeny označené „Ostatní“ patří *Cyanobacteria* a *Proteobacteria*. Vlastní zpracování dle (Huerta-Cepas et al., 2016)

Obrázek 30: Sekvence proteinu Jag u vybraných druhů z kmene *Firmicutes* a *Actinobacteria*



Obrázek zachycuje porovnání sekvence proteinu Jag u zástupců kmenů *Firmicutes* a *Actinobacteria*. Modře jsou znázorněny aminokyseliny s nízkou hodnotou shody (více než 50 %). Červené písmo znázorňuje aminokyseliny s vysokou hodnotou shody (více než 90 %). Černý obdélník zvyrazňuje T89, konzervovaný u kmene *Firmicutes*. Převzato a upraveno z Corpet (1988).

Gen pro protein Jag u *S. pneumoniae* je součástí transkripční jednotky rnpA (spr1853) - YidC/Oxa1 (spr1852) - Jag/SpoIIIJ (spr1851). Membránová invertáza YidC se podílí na skládání a inzerci membránových proteinů do membrány po interakci se Sec dependentní dráhou (Scotti et al., 2000), nebo bez ní (Samuelson et al., 2000). Genomy gram pozitivních bakterií kódují 2 paralogy YidC, ale u *S. pneumoniae* nebyla jejich funkce popsána. Zajímavou hypotézu o traskripčním a funkčním spojení proteinů Jag a YidC nabízí Ulrych (2016), který navrhuje, že by protein Jag mohl nepřímo ovlivňovat cílení integrálních membránových proteinů do membrány.

Absence proteinu Jag má za následek zmenšení buněk, které jsou tvarově podobné divokému kmeni. Obdobný trend byl pozorován například u kmene s deletovanou PhpP fosfatázou, zatímco jeho nadprodukce vede k prodloužení buněk, jejichž fenotyp připomíná mutaci v StkP kináze (Ulrych et al., 2016). Hlavním předpokladem této práce proto bylo, že se protein Jag podílí na buněčném dělení či syntéze buněčné stěny.

6.1 Charakterizace zkrácených forem

Nejprve jsme chtěli zjistit, jaká je funkce jednotlivých domén. K tomuto účelu byly připraveny kmeny exprimující zkrácené formy proteinu Jag - *jag* Δ 188-328 (Sp315), *jag* Δ 3-53 (Sp316) a *jag* Δ 268-328 (Sp362). Expres zkrácených forem proteinu Jag a jejich fosforylace byla ověřena imunodetekcí, pomocí které se podařilo zjistit, že fosforylované formy (Jag Δ 188-328 a Jag Δ 268-328) exprimují kmeny Sp315 a Sp362. Fosforylaci třetí zkrácené formy Jag Δ 3-53 (u kmene Sp316 - *jag* Δ 3-53) prozatím nemůžeme vyloučit, protože je možné, že by tento signál mohl být maskován silným fosforylačním signálem proteinu DivIVA, který putuje v těsné blízkosti proteinu Jag. U této formy (Jag Δ 3-53) je odstraněna Jag_N doména a T89 zůstal zachován. Proto existuje předpoklad, že je tato forma také měla fosforylována, ačkoliv její fosforylace zatím nebyla detekována. O nepřítomnosti fosforylace ale svědčí i fakt, že na rozdíl od ostatních forem proteinu Jag putuje na gelu pouze v jedné izoformě. Rozdělení fosforylovaných izoform je detekovatelné na 2D SDS PAGE, kdy dochází k dělení proteinů podle jejich izoelektrického bodu, často lze ale jednotlivé izoformy deketovat i na 1D SDS PAGE. Předpokládá se, že v závislosti na místním náboji okolních aminokyselinových zbytků, fosfát mění SDS povlak proteinu, a proto lze pozorovat odlišnou pohyblivost fosforylovaných a nefosforylovaných forem proteinu. Toto pravidlo však není univerzální a fosforylované a nefosforylované formy

proteinu mohou migrovat i stejně, jak shrnuje Peck (2006). Například rekombinantní protein FtsA po fosforylaci kinázou StkP *in vitro* má minimálně dvě fosforylované izoformy na 1D gelu (Kubincová, 2017). Obdobně dochází ke změně hybnosti oproti nemutované formě proteinu LocZ při zavedení fosfoablativní mutace (Holečková et al., 2015). Pokud tato forma proteinu (Jag Δ 3-53) skutečně není fosforylována, nabízí se několik možných vysvětlení. N-terminální oblast chybějící u této formy proteinu Jag, která podle uváděných výsledků má vliv na lokalizaci proteinu Jag do membrány a může být zodpovědná za interakci s StkP taktéž ukotvenou v membráně. Po odstranění této interakční domény by tedy nedocházelo k rozeznání proteinu a jeho fosforylaci. Dalším vysvětlením absence fosforylace může být například změna konformace proteinu po odstranění Jag_N domény a ztráta schopnosti tohoto substrátu být fosforylován kinázou StkP. Následujícím krokem k vyjasnění, zda je zkrácená forma Jag Δ 3-53 fosforylována či nikoliv, bude vytvořit kmen s fosfoablativní záměnou DivIVA, čímž zmizí jeho silný fosforylační signál a bude možné ověřit, zda je forma Jag Δ 3-53 fosforylována či nikoliv.

Kmen s deletovaným genem *jag* tvoří kratší buňky než WT, což odpovídá dosavadním publikovaným výsledkům (Ulrych et al., 2016). Shodný fenotyp jako kmen Δ *jag* vykazuje i kmen *jag* Δ 188-328 (Sp315) s odstraněnou C- koncovou oblastí, zahrnující KH a R3H domény. Kmen, který má odstraněnou pouze R3H doménu, *jag* Δ 268-328 (Sp362), se fenotypově více podobá divokému kmeni než kmeni Δ *jag* (Sp295). Pokud dojde k odstranění Jag_N domény, jak je tomu u kmene *jag* Δ 3-53 (Sp316), dojde k tvorbě statisticky významně delších buněk než tvoří WT. Tyto výsledky naznačují, že za zmenšení velikosti jsou zodpovědné C-koncové domény – R3H a KH, přičemž větší efekt na změnu morfologie buněk má delece KH domény.

Dříve uváděným výsledkům odpovídají i výstupy růstové charakterizace zkrácených forem, podle kterých kmeny Δ *jag* (Sp295) s dobou zdvojení 37 minut a *jag* Δ 188-328 (Sp315), u kterého je doba zdvojení 36 min, rostou pomaleji než divoký kmen ($T = 32$ min). Tyto výsledky odpovídají i dosud publikovaným závěrům (Ulrych et al., 2016). Kmen *jag* Δ 268-328 (Sp362) roste srovnatelně s divokým kmenem. Kmen *jag* Δ 3-53 (Sp316) má také srovnatelnou dobu zdvojení jako divoký kmen, ovšem kratší lag fázi. Tyto výsledky opět naznačují, že odstranění celé C-koncové oblasti má za následek projevení stejného fenotypu

jako u kmene *Δjag* (Sp295). Odstranění R3H a zachování KH domény vede k částečnému navrácení fenotypu pozorovaného u WT.

Protože byl protein Jag identifikován v membránové frakci a jeho sekvence neobsahuje žádnou předpokládanou transmembránovou oblast (Ulrych et al., 2016), pokusili jsme se zjistit, která z domén je zodpovědná za interakci s membránou. Díky frakcionaci byl hrubý buněčný lyzát kmenů exprimujících zkrácené formy proteinu Jag rozdělen na MF a CF. Obsah proteinů v jednotlivých frakcích byl porovnán pomocí imunodetekce s použitím protilátky anti-Jag. U kmene *jag Δ188-328* (Sp315) s odstraněnými C-koncovými doménami došlo ke snížení intenzity cytoplazmatického signálu a nárůstu signálu v membránové frakci. U kmene *jag Δ3-53* (Sp316) exprimujícího protein Jag s odstraněnou Jag_N doménou došlo k silnému nárůstu intenzity signálu v cytoplazmatické frakci. Kmen *jag Δ268-328* (Sp362) s odstraněnou R3H doménou má mírně zvýšenou intenzitu cytoplazmatického signálu oproti divokému kmeni. Tyto výsledky naznačují, že za lokalizaci proteinu do membrány je zodpovědná Jag_N koncová doména. Protein Jag obdobně jako protein DivIVA nemá žádnou předpokládanou transmembránovou oblast, přesto jsou tyto proteiny nacházeny v membránové frakci. U proteinu DivIVA bylo zjištěno, že se na membránu váže přímo na základě rozeznání oblasti silného zakřivení povrchu nacházejícího se např. v septu či na pólech buňky. Zodpovědnost za tuto lokalizaci DivIVA proteinu má 20 aminokyselin dlouhá sekvence na N-konci proteinu (Halbedel et al., 2009). Vzhledem k tomu, že je protein Jag lokalizován v cytoplazmě a je značně obohacen pouze v oblasti septa nelze předpokládat, že by interakce s membránou byla podobného charakteru jako u proteinu DivIVA. Zdá se pravděpodobnější, že je Jag k membráně kotven prostřednictvím Jag_N domény, která může interagovat s dalšími membránovými proteiny.

Dalším úkolem bylo stanovit lokalizaci proteinu Jag v buňce. Za tímto účelem byl nejprve připraven kmen Sp317 (*Δjag bga::pZn-gfp-spr1851*), který exprimoval Jag fúzovaný s GFP na N-konci ze zinkem indukovaného promotoru. U takto exprimovaného proteinu byla při indukci zřetelná lokalizace, ale nedocházelo ke komplementaci WT fenotypu. Proto byl připraven kmen Sp336 (*Δjag bga::pZn-jag-gfp*) exprimující Jag fúzovaný s GFP na C-konci ze zinkem indukovaného promotoru. Přestože tento kmen byl schopen komplementace fenotypu divokého kmene, nebylo možné u tohoto fúzního proteinu docílit rovnoměrného lokalizačního signálu u všech buněk (data z analýzy kmenů Sp317 a Sp336 nejsou v práci

prezentována). Proto byla následně pro analýzu zvolena exprese proteinu z nativního lokusu, přičemž sekvence *gfp* byla připojena k C-konci genu pro Jag. Ke stanovení lokalizace proteinu Jag a jeho zkrácených forem Jag Δ 188-328 a Jag Δ 3-58 byly připraveny kmeny Sp370, Sp371 a Sp372 exprimující protein Jag fúzovaný s GFP z nativního lokusu. Imunodetekcí bylo ověřeno, že se proteiny exprimují v očekávaných velikostech a na gelu migrují z hlediska počtu izoform stejně jako zkrácené formy bez GFP. Zdá se, že protein Jag-GFP Δ 188-328 se exprimuje lépe, než divoký kmen a než zkrácená forma proteinu Jag Δ 188-328 bez GFP. Tento jev může být způsoben stabilizací proteinu po navázání GFP. Expres zkrácené formy Jag Δ 3-53 se i po navázání GFP zdá být nezměněna. Nemutovaný protein Jag-GFP vykazuje difuzní cytoplazmatický signál a je v buňkách obohacen v septu. V časně fázi buněčného dělení signál zůstává v původním septu mateřské buňky, tedy ve středu mezi nově vznikajícími buňkami a v pozdějších fázích se z centrální oblasti přesouvá do sept vznikajících dceřiných buněk. Obdobný lokalizační profil byl pozorován i u kmene Sp371, který má odstraněnou C-koncovou část proteinu Jag a exprimuje protein Jag-GFP Δ 188-328. Naopak u kmene Sp372 exprimujícího Jag protein bez Jag_N terminální domény – Jag-GFP Δ 3-53 byl signál delokalizovaný v cytoplazmě. Ačkoliv se podle imunodetekce jedná o protein stabilní, nelze bez povšimnutí přejít, že podle fluorescence tento mutovaný protein tvoří cytoplazmatické shluky či agregáty (viz obrázek 23). Lokalizační profil proteinu Jag je podobný profilu jiných proteinů buněčného dělení, jako jsou proteiny StkP kináza (Gieffing et al., 2010) a protein buněčného dělení FtsA (Mura et al., 2017), které ale nemají zastoupení v cytoplazmě.

6.2 Vliv proteinu Jag na lokalizaci vybraných proteinů buněčného dělení a komplexů syntézy buněčné stěny

Za účelem zjištění, zda má protein Jag vliv na lokalizaci jiných proteinů buněčného dělení, byly vybrány tři proteiny účastníci se různých fází buněčného dělení. LocZ jako zástupce proteinů hrajících roli v časných fázích buněčného dělení, protein DivIVA představující protein pozdní fáze dělení a protein FtsA. Porovnáním lokalizačních profilů těchto proteinů, které byly exprimovány kmeny se zachovaným či odstraněným proteinem Jag, bylo zjištěno, že přítomnost či absence proteinu Jag neovlivňuje jejich lokalizaci.

Vzhledem k tomu, že na buněčném dělení se kromě vlastních proteinů buněčného dělení podílí i komplexy syntézy buněčné stěny, bylo uvažováno o tom, že by odstranění proteinu

Jag mohlo mít vliv na lokalizaci komplexů syntézy buněčné stěny. Proto byl k exponenciálně rostoucí kultuře přidán VAN-FL a lokalizace aktivní syntézy PG byla porovnána u divokého kmene a u kmene s odstraněným proteinem Jag. Prezentované výsledky naznačují, že delece proteinu Jag neovlivňuje lokalizaci komplexu syntézy buněčné stěny. Zároveň ale bylo v naší laboratoři pomocí dvouhybridního systému zjištěno, že s proteinem Jag kromě kinázy StkP interaguje i protein GpsB (nepublikovaná data). Protein GpsB je hlavním proteinem regulujícím přechod mezi septální a periferní syntézou PG u *S. pneumoniae* (Rued et al., 2017), proto dalším krokem pro odhalení vztahu mezi proteinem Jag a komplexy syntézy buněčné stěny bude kolokalizace Jag-GFP s dalšími proteiny septální i periferní syntézy PG, případně kolokalizace Jag-GFP s VAL-FL barvením.

6.3 Stanovení role fosforylace na T89

Velké množství signálních kaskád je regulováno pomocí přenosu fosfátové skupiny na fosforylovatelné zbytky. U proteinu Jag byl jako hlavní zbytek fosforylovaný pomocí StkP identifikovaný threonin v pozici 89 s tím, že protein Jag obsahuje ještě jedno minoritní místo fosforylace na neznámém T zbytku. U proteinu Jag byl dříve zkoumán vliv fosforylace T89 jeho záměnou za fosfoablativní alanin u kmene exprimujícího modifikovaný protein ze zinkem indukovaného promotoru na pozadí delečního kmene ($\Delta jag bga::pZn-jag-flag T89A$). Při této záměně došlo ke změně pohyblivosti proteinu Jag na 1D SDS-PAGE. Imunodetekcí s protilátkou anti-P-Thr byl pozorován značný úbytek signálu, který však úplně nevymizel. Výsledky naznačují, že mutací T89 došlo ke zvýšení fosforylace druhého, zatím nepopsaného, místa, což by mohlo být výhodné pro jeho identifikaci. Z hlediska vlivu fosforylace na morfologii buněk při indukci exprese tohoto proteinu docházelo ke komplementaci fenotypu delečního kmene. (Ulrych et al., 2016).

V této práci byl zkoumán vliv fosfomimetických záměn T89, kdy byl T zaměněn za D a E. Imunodetekcí bylo ověřeno, že k expresi takto pozměněných proteinů dochází pouze v závislosti na přítomnosti induktoru. Takto modifikované proteiny migrují na gelu v jedné izoformě, která má oproti nemutovanému proteinu změněnou hybnost obdobně jako mutovaný protein obsahující záměnu T89 za A (Ulrych et al., 2016). Shodně s fosfoablativním kmenem komplementují i kmeny obsahující fosfomimentické záměny fenotyp divokého kmene po přidání induktoru exprese. Z těchto výsledků vyplývá, že fosforylace na T89 nemá vliv na morfologii buněk. Je ale známo, že na rozdíl

od fosfoablativních záměn záměny fosfomimetické napodobující trvale fosforylovaný stav proteinu, často nefungují. Při přípravě fosfomimetických záměn proteinu jsou postulovány 2 problémy. První problém představuje neschopnost případného interakčního partnera rozpoznat protein kvůli zavedené mutaci. Druhým problémem je, že negativní náboj aminokyselinových zbytků E či D přesně neodpovídá negativnímu náboji fosforylovaného zbytku. Fosfomimetické záměny tedy lépe fungují, pokud jsou v sousedství mutovaného místa další E či D, které by pomohly rozdíl v nábojích překonat (viz přehledový článek Dephoure et al., 2013). V těsné blízkosti T89 proteinu Jag jsou dva zbytky E, tudíž lze předpokládat, že zavedená fosfomimetická mutace je funkční. Kmeny exprimující fosfomimetické záměny byly připraveny se záměrem, že by díky zvýšené fosforylaci minoritního místa u fosfoablativní mutanty (Ulrych et al., 2016) mohly být použity rovněž k jeho identifikaci. U těchto kmenů však zvýšená fosforylace minoritního místa nebyla pozorována. Navíc výsledky z nedávné hmotnostní spektrometrie toto místo odhalily. Je jím pravděpodobně threonin v pozici 56 (Laboratoř buněčné signalizace, nepublikované výsledky), který bude předmětem dalšího studia.

7 Souhrn

Výsledky této diplomové práce lze shrnout do následujících bodů:

- Absence proteinu Jag vede k tvorbě kratších buněk, než tvoří buňky divokého kmene. Byly připraveny kmeny s delecí jednotlivých domén a prokázalo se, že za tento fenotyp jsou zodpovědné domény KH a R3H, přičemž vliv KH domény je významnější.
- Kmen s delecí genu *jag* roste pomaleji s delší dobou zdvojení oproti divokému kmeni. Obdobně roste kmen s odstraněnou KH a R3H doménou. Odstraněním R3H domény zůstávají růstové vlastnosti obdobné jako u divokého kmene.
- Protein Jag má difuzní cytoplazmatický lokalizační signál se značným obohacením v oblasti septa. Stejný lokalizační profil má i zkrácená forma proteinu Jag s odstraněnými C-koncovými doménami (KH a R3H). Za obohacení v oblasti septa je zodpovědná Jag_N koncová doména.
- Protein Jag nemá vliv na lokalizaci komplexů syntézy buněčné stěny ani na lokalizaci časných a pozdních proteinů buněčného dělení.
- Fosforylace na T89 nemá vliv na buněčnou morfologii.

8 Použitá literatura

- Addinall, S.G., Lutkenhaus, J. (1996): FtsA Is Localized to the Septum in an FtsZ-Dependent Manner. *J. Bacteriol.* 178: 7167–7172.
- Agarwal, S., Agarwal, S., Pancholi, P., Pancholi, V. (2012): Strain-Specific Regulatory Role of Eukaryote-Like Serine/Threonine Phosphatase in Pneumococcal Adherence. *Infect. Immun.* 80: 1361–1372.
- Avery, O.T., MacLeod, C.M., McCarty, M. (1944): Studies on the Chemical Nature of the Substance Inducing Transformation of Pneumococcal Types. *J. Exp. Med.* 79: 137–158.
- Beall, B., Lutkenhaus, J. (1992): Impaired Cell Division and Sporulation of a *Bacillus subtilis* Strain with the *ftsA* Gene Deleted. *J. Bacteriol.* 174: 2398–2403.
- Beilharz, K., Nováková, L., Fadda, D., Branny, P., Massidda, O., Veening, J.-W. (2012): Control of Cell Division in *Streptococcus pneumoniae* by the Conserved Ser/Thr Protein Kinase StkP. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109: E905–E913.
- Berry, A.M., Lock, R.A., Thomas, S.M., Rajan, D.P., Hansman, D., Paton, J.C. (1994): Cloning and Nucleotide Sequence of the *Streptococcus pneumoniae* Hyaluronidase Gene and Purification of the Enzyme from Recombinant *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 62: 1101–1108.
- Bi, E., Lutkenhaus, J. (1991): FtsZ Ring Structure Associated with Division in *Escherichia coli*. *Nature* 354: 161–164.
- Buddelmeijer, N., Beckwith, J. (2004): A Complex of the *Escherichia coli* Cell Division Proteins FtsL, FtsB and FtsQ Forms Independently of its Localization to the Septal Region. *Mol. Microbiol.* 52: 1315–1327.
- Busiek, K.K., Margolin, W. (2015): Bacterial Actin and Tubulin Homologs in Cell Growth and Division. *Curr. Biol.* 25: R243–R254.
- Corpet, F. (1988): Multiple Sequence Alignment with Hierarchical Clustering. *Nucleic Acids Res.* 16: 10881–10890.
- Cvitkovitch, D.G., Li, Y.-H., Ellen, R.P. (2003): Quorum Sensing and Biofilm Formation in Streptococcal Infections. *J. Clin. Invest.* 112: 1626–1632.
- D’Amato, R.F., Swenson, J.M., McKinley, G.A., Hochstein, L., Wallman, A.A., Cleri, D.J., Mastellone, A.J., Fredericks, L., Gonzalez, L., Pincus, D.H. (1987): Quantitative Antimicrobial Ausceptibility Test for *Streptococcus pneumoniae* Using Inoculum Supplemented with Whole Defibrinated Sheep Blood. *J. Clin. Microbiol.* 25: 1753–1756.

- Danilova, O., Reyes-Lamothe, R., Pinskaya, M., Sherratt, D., Possoz, C. (2007): MukB Colocalizes with the OriC Region and Is Required for Organization of the Two *Escherichia coli* Chromosome Arms into Separate Cell Halves. *Mol. Microbiol.* 65: 1485–1492.
- Davies, D.G., Parsek, M.R., Pearson, J.P., Iglewski, B.H., Costerton, J. t, Greenberg, E.P. (1998): The Involvement of Cell-to-Cell Signals in the Development of a Bacterial Biofilm. *Science* 280: 295–298.
- De Boer, P.A.J., Crossley, R., Rothfield, L. (1992): The Essential Bacterial Cell-Division Protein FtsZ is a GTPase. *Nature* 359: 254–256.
- De Boer, P.A.J., Crossley, R.E., Rothfield, L.I. (1989): A Division Inhibitor and a Topological Specificity Factor Coded for by the Minicell Locus Determine Proper Placement of the Division Septum in *E. coli*. *Cell* 56: 641–649.
- De Las Rivas, B., García, J.L., López, R., García, P. (2002): Purification and Polar Localization of Pneumococcal LytB, a Putative Endo- β -N-Acetylglucosaminidase: the Chain-Dispersing Murein Hydrolase. *J. Bacteriol.* 184: 4988–5000.
- Dephoure, N., Gould, K.L., Gygi, S.P., Kellogg, D.R. (2013). Mapping and Analysis of Phosphorylation Sites: a Quick Guide for Cell Biologists. *Mol. Biol. Cell* 24: 535–542.
- Durand-Heredia, J., Rivkin, E., Fan, G., Morales, J., Janakiraman, A. (2012): Identification of ZapD as a Cell Division Factor That Promotes the Assembly of FtsZ in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 194: 3189–3198.
- Eberhardt, A., Wu, L.J., Errington, J., Vollmer, W., Veening, J.-W. (2009): Cellular Localization of Choline-Utilization Proteins in *Streptococcus pneumoniae* Using Novel Fluorescent Reporter Systems. *Mol. Microbiol.* 74: 395–408.
- Echenique, J., Kadioglu, A., Romao, S., Andrew, P.W., Trombe, M.-C. (2004): Protein Serine/Threonine Kinase StkP Positively Controls Virulence and Competence in *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* 72: 2434–2437.
- Errington, J., Appleby, L., Daniel, R.A., Goodfellow, H., Partridge, S.R., Yudkin, M.D. (1992): Structure and function of the *spoIIIJ* gene of *Bacillus subtilis*: a Vegetatively Expressed Gene that is Essential for Sigma G Activity at an Intermediate Stage of Sporulation. *J. Gen. Microbiol.* 138: 2609–2618.
- Fadda, D., Pischedda, C., Caldara, F., Whalen, M.B., Anderluzzi, D., Domenici, E., Massidda, O. (2003): Characterization of divIVA and Other Genes Located in the Chromosomal Region Downstream of the *dcw* Cluster in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* 185: 6209–6214.
- Fadda, D., Santona, A., D’Ulisse, V., Ghelardini, P., Ennas, M.G., Whalen, M.B., Massidda, O. (2007): *Streptococcus pneumoniae* DivIVA: Localization and Interactions in a MinCD-Free Context. *J. Bacteriol.* 189: 1288–1298.

- Falk, S.P., Weisblum, B. (2013): Phosphorylation of the *Streptococcus pneumoniae* Cell Wall Biosynthesis Enzyme MurC by a Eukaryotic-Like Ser/Thr Kinase. *FEMS Microbiol. Lett.* 340: 19–23.
- Fenton, A.K., Mortaji, L.E., Lau, D.T.C., Rudner, D.Z., Bernhardt, T.G. (2016): CozE is a Member of the MreCD Complex that Directs Cell Elongation in *Streptococcus pneumoniae*. *Nat. Microbiol.* 2: 16237
- Feucht, A., Lucet, I., Yudkin, M.D., Errington, J. (2001): Cytological and Biochemical Characterization of the FtsA Cell Division Protein of *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 40: 115–125.
- Fiuza, M., Canova, M.J., Zanella-Cléon, I., Becchi, M., Cozzone, A.J., Mateos, L.M., Kremer, L., Gil, J.A., Molle, V. (2008): From the Characterization of the Four Serine/Threonine Protein Kinases (PknA/B/G/L) of *Corynebacterium glutamicum* toward the Role of PknA and PknB in Cell Division. *J. Biol. Chem.* 283: 18099–18112.
- Fleurie, A., Lesterlin, C., Manuse, S., Zhao, C., Cluzel, C., Lavergne, J.-P., Franz-Wachtel, M., Macek, B., Combet, C., Kuru, E., VanNieuwenhze, M.S., Brun, Y.V., Sherratt, D., Grangeasse, C. (2014): MapZ Beacons the Division Sites and Positions FtsZ-Rings in *Streptococcus pneumoniae*. *Nature* 516: 259–262.
- Gerding, M.A., Liu, B., Bendezú, F.O., Hale, C.A., Bernhardt, T.G., de Boer, P.A.J. (2009): Self-Enhanced Accumulation of FtsN at Division Sites and Roles for Other Proteins with a SPOR Domain (DamX, DedD, and RlpA) in *Escherichia coli* Cell Constriction. *J. Bacteriol.* 191: 7383–7401.
- Gieffing, C., Jelencsics, K.E., Gelbmann, D., Senn, B.M., Nagy, E. (2010): The Pneumococcal Eukaryotic-Type Serine/Threonine Protein Kinase StkP Co-localizes with the Cell Division Apparatus and Interacts with FtsZ *In Vitro*. *Microbiology* 156: 1697–1707.
- Gieffing, C., Meinke, A.L., Hanner, M., Henics, T., Minh, D.B., Gelbmann, D., Lundberg, U., Senn, B.M., Schunn, M., Habel, A., Henriques-Normark, B., Örtqvist, Å., Kalin, M., von Gabain, A., Nagy, E. (2008): Discovery of a Novel Class of Highly Conserved Vaccine Antigens Using Genomic Scale Antigenic Fingerprinting of Pneumococcus with Human Antibodies. *J. Exp. Med.* 205: 117–131.
- Gill, S.C., Weitzel, S.E., von Hippel, P.H. (1991): *Escherichia coli* Sigma 70 and NusA Proteins. I. Binding Interactions with Core RNA Polymerase in Solution and within the Transcription Complex. *J. Mol. Biol.* 220: 307–324.
- Goffin, C., Ghuysen, J.-M. (1998): Multimodular Penicillin-Binding Proteins: An Enigmatic Family of Orthologs and Paralogs. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 1079–1093.
- Graumann, P.L., Losick, R., Strunnikov, A.V. (1998): Subcellular Localization of *Bacillus subtilis* SMC, a Protein Involved in Chromosome Condensation and Segregation. *J. Bacteriol.* 180: 5749–5755.
- Griffith, F. (1928): The Significance of Pneumococcal Types. *J. Hyg. (Lond.)* 27: 113–159.

- Grishin, N.V. (2001): KH Domain: One Motif, Two Folds. *Nucleic Acids Res.* 29: 638–643.
- Grishin, N.V. (1998): The R3H Motif: a Domain that Binds Single-Stranded Nucleic Acids. *Trends Biochem. Sci.* 23: 329–330.
- Guenzi, E., Gasc, A.-M., Sicard, M.A., Hakenbeck, R. (1994): A Two-Component Signal-Transducing System is Involved in Competence and Penicillin Susceptibility in Laboratory Mutants of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* 12: 505–515.
- Guilmi, A.M.D., Dessen, A., Dideberg, O., Vernet, T. (2003): Functional Characterization of Penicillin-Binding Protein 1b from *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* 185: 1650–1658.
- Gusarov, I., Nudler, E. (2001): Control of Intrinsic Transcription Termination by N and NusA. *Cell* 107: 437–449.
- Halbedel, S., Visser, L., Shaw, M., Wu, L.J., Errington, J., Marenduzzo, D., Hamoen, L.W., Rok, L. (2009): Localisation of DivIVA by Targeting to Negatively Curved Membranes. *EMBO J.* 28: 2272–2282.
- Hale, C.A., Boer, P.A. de (1997): Direct Binding of FtsZ to ZipA, an Essential Component of the Septal Ring Structure that Mediates Cell Division in *E. coli*. *Cell* 88: 175–185.
- Hammerschmidt, S., Wolff, S., Hocke, A., Rosseau, S., Müller, E., Rohde, M. (2005): Illustration of Pneumococcal Polysaccharide Capsule during Adherence and Invasion of Epithelial Cells. *Infect. Immun.* 73: 4653–4667.
- Hardt, P., Engels, I., Rausch, M., Gajdiss, M., Ulm, H., Sass, P., Ohlsen, K., Sahl, H.-G., Bierbaum, G., Schneider, T., Grein, F. (2017): The Cell Wall Precursor Lipid II Acts as a Molecular Signal for the Ser/Thr Kinase PknB of *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Med. Microbiol.* 307: 1–10.
- Hausdorff, W.P., Bryant, J., Paradiso, P.R., Siber, G.R. (2000): Which Pneumococcal Serogroups Cause the Most Invasive Disease: Implications for Conjugate Vaccine Formulation and Use, Part I. *Clin. Infect. Dis.* 30: 100–121.
- Håvarstein, L.S., Gaustad, P., Nes, I.F., Morrison, D.A. (1996): Identification of the Streptococcal Competence-Pheromone Receptor. *Mol. Microbiol.* 21: 863–869.
- Håvarstein, L.S., Martin, B., Johnsborg, O., Granadel, C., Claverys, J.-P. (2006): New Insights into the Pneumococcal Fratricide: Relationship to Clumping and Identification of a Novel Immunity Factor. *Mol. Microbiol.* 59: 1297–1037.
- Holečková, N., Doubravová, L., Massidda, O., Molle, V., Buriánková, K., Benada, O., Kofroňová, O., Ulrych, A., Branny, P. (2015): LocZ Is a New Cell Division Protein Involved in Proper Septum Placement in *Streptococcus pneumoniae*. *mBio* 6: e01700-14.
- Huerta-Cepas, J., Szklarczyk, D., Forslund, K., Cook, H., Heller, D., Walter, M.C., Rattei, T., Mende, D.R., Sunagawa, S., Kuhn, M., Jensen, L.J., von Mering, C., Bork, P. (2016):

- eggNOG 4.5: a Hierarchical Orthology Framework with Improved Functional Annotations for Eukaryotic, Prokaryotic and Viral Sequences. *Nucleic Acids Res.* 44: D286–D293.
- Hyams, C., Camberlein, E., Cohen, J.M., Bax, K., Brown, J.S. (2010): The *Streptococcus pneumoniae* Capsule Inhibits Complement Activity and Neutrophil Phagocytosis by Multiple Mechanisms. *Infect. Immun.* 78: 704–715.
- Chalker, A.F., Lupas, A., Ingraham, K., So, C.Y., Lunsford, R.D., Li, T., Bryant, A., Holmes, D.J., Marra, A., Pearson, S.C., Ray, J., Burnham, M.K.R., Palmer, L.M., Biswas, S., Zalacain, M. (2000): Genetic Characterization of Gram-Positive Homologs of the XerCD Site-Specific Recombinases. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2: 225–233.
- Choi, K.M., Atkins, J.F., Gesteland, R.F., Brimacombe, R. (1998): Flexibility of the Nascent Polypeptide Chain within the Ribosome. *Eur. J. Biochem.* 255: 409–413.
- Ireton, K., Gunther, N.W., Grossman, A.D. (1994): *spo0J* Is Required for Normal Chromosome Segregation as well as the Initiation of Sporulation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 176: 5320–5329.
- Ishikawa, S., Kawai, Y., Hiramatsu, K., Kuwano, M., Ogasawara, N. (2006): A New FtsZ-Interacting Protein, YlmF, Complements the Activity of FtsA during Progression of Cell Division in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 60: 1364–1380.
- Jang, A.-Y., Seo, H.S., Lin, S., Chung, G.-H., Kim, H.W., Lim, S., Zhao, L., Park, I.H., Lim, J.H., Kim, K.-H. (2017): Molecular Characterization of Pneumococcal Surface Protein K, a Potential Pneumococcal Vaccine Antigen. *Virulence*.
- Kang, C.-M., Abbott, D.W., Park, S.T., Dascher, C.C., Cantley, L.C., Husson, R.N. (2005): The *Mycobacterium tuberculosis* Serine/Threonine Kinases PknA and PknB: Substrate Identification and Regulation of Cell Shape. *Genes Dev.* 19: 1692–1704.
- Kell, C.M., Sharma, U.K., Dowson, C.G., Town, C., Balganes, T.S., Spratt, B.G. (1993): Deletion Analysis of the Essentiality of Penicillin-Binding Proteins 1A, 2B and 2X of *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 106: 171–175.
- Kjos, M., Veening, J.-W. (2014): Tracking of Chromosome Dynamics in Live *Streptococcus pneumoniae* Reveals that Transcription Promotes Chromosome Segregation. *Mol. Microbiol.* 91: 1088–1105.
- Kubincová, H. (2017): Kontrola buněčného dělení *Streptococcus pneumoniae* unikátní signální dráhou, Diplomová práce. Univerzita Karlova.
- Lacks, S., Hotchkiss, R.D. (1960): A Study of the Genetic Material Determining an Enzyme Activity in Pneumococcus. *Biochim. Biophys. Acta* 39: 508–518.
- Land, A.D., Winkler, M.E. (2011): The Requirement for Pneumococcal MreC and MreD Is Relieved by Inactivation of the Gene Encoding PBP1a. *J. Bacteriol.* 193: 4166–4179.

- Lara, B., Rico, A.I., Petruzzelli, S., Santona, A., Dumas, J., Biton, J., Vicente, M., Mingorance, J., Massidda, O. (2005): Cell Division in Cocci: Localization and Properties of the *Streptococcus pneumoniae* FtsA Protein. *Mol. Microbiol.* 55: 699–711.
- Levin, P.A., Kurtser, I.G., Grossman, A.D. (1999): Identification and Characterization of a Negative Regulator of FtsZ Ring Formation in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96: 9642–9647.
- Liu, G., Draper, G.C., Donachie, W.D. (1998): FtsK Is a Bifunctional Protein Involved in Cell Division and Chromosome Localization in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 29: 893–903.
- Liu, K., Hanna, M.M. (1995): NusA Contacts Nascent RNA in *Escherichia coli* Transcription Complexes. *J. Mol. Biol.* 247: 547–558.
- Lovering, A.L., De Castro, L., Lim, D., Strynadka, N.C.J. (2006): Structural Analysis of an “Open” Form of PBP1B from *Streptococcus pneumoniae*. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* 15: 1701–1709.
- Luo, P., Li, H., Morrison, D.A. (2003): ComX is a Unique Link Between Multiple Quorum Sensing Outputs and Competence in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* 50: 623–633.
- Lutkenhaus, J.F., Donachie, W.D. (1979): Identification of the *ftsA* Gene Product. *J. Bacteriol.* 137: 1088–1094.
- Madec, E., Laszkiewicz, A., Iwanicki, A., Obuchowski, M., Séror, S. (2002): Characterization of a Membrane-Linked Ser/Thr Protein Kinase in *Bacillus subtilis*, Implicated in Developmental Processes. *Mol. Microbiol.* 46: 571–586.
- Maestro, B., Nováková, L., Heseck, D., Lee, M., Leyva, E., Mobashery, S., Sanz, J.M., Branny, P. (2011): Recognition of Peptidoglycan and β -lactam Antibiotics by the Extracellular Domain of the Ser/Thr Protein Kinase StkP from *Streptococcus pneumoniae*. *FEBS Lett.* 585: 357–363.
- Maggi, S., Massidda, O., Luzi, G., Fadda, D., Paolozzi, L., Ghelardini, P. (2008): Division Protein Interaction Web: Identification of a Phylogenetically Conserved Common Interactome between *Streptococcus pneumoniae* and *Escherichia coli*. *Microbiology* 154: 3042–3052.
- Marchler-Bauer, Aron, Yu Bo, Lianyi Han, Jane He, Christopher J. Lanczycki, Shennan Lu, Farideh Chitsaz, et al. (2017): CDD/SPARCLE: Functional Classification of Proteins via Subfamily Domain Architectures. *Nucleic Acids Res.* 45: D200–203.
- Marston, A.L., Errington, J. (1999): Selection of the Midcell Division Site in *Bacillus subtilis* through MinD-Dependent Polar Localization and Activation of MinC. *Mol. Microbiol.* 33: 84–96.

- Mascarenhas, J., Soppa, J., Strunnikov, A.V., Graumann, P.L. (2002): Cell Cycle-Dependent Localization of Two Novel Prokaryotic Chromosome Segregation and Condensation Proteins in *Bacillus subtilis* that Interact with SMC Protein. *EMBO J.* 21: 3108–3118.
- Massidda, O., Nováková, L., Vollmer, W. (2013): From Models to Pathogens: How Much Have We Learned about *Streptococcus pneumoniae* Cell Division? *Environ. Microbiol.* 15: 3133–3157.
- Meeske, A.J., Riley, E.P., Robins, W.P., Uehara, T., Mekalanos, J.J., Kahne, D., Walker, S., Kruse, A.C., Bernhardt, T.G., Rudner, D.Z. (2016): SEDS Proteins Are a Widespread Family of Bacterial Cell Wall Polymerases. *Nature* 537: 634–638.
- Mercer, K.L.N., Weiss, D.S. (2002): The *Escherichia coli* Cell Division Protein FtsW Is Required To Recruit Its Cognate Transpeptidase, FtsI (PBP3), to the Division Site. *J. Bacteriol.* 184: 904–912.
- Minnen, A., Attaiech, L., Thon, M., Gruber, S., Veening, J.-W. (2011): SMC Is Recruited to OriC by ParB and Promotes Chromosome Segregation in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* 81: 676–688.
- Morlot, C., Bayle, L., Jacq, M., Fleurie, A., Tourcier, G., Galisson, F., Vernet, T., Grangeasse, C., Di Guilmi, A.M. (2013): Interaction of Penicillin-Binding Protein 2x and Ser/Thr protein kinase StkP, two key players in *Streptococcus pneumoniae* R6 morphogenesis. *Mol. Microbiol.* 90: 88–102.
- Morlot, C., Noirclerc-Savoye, M., Zapun, A., Dideberg, O., Vernet, T. (2004): The d,d-carboxypeptidase PBP3 Organizes the Division Process of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* 51: 1641–1648.
- Morrison, D.A., Trombe, M.C., Hayden, M.K., Waszak, G.A., Chen, J.D. (1984): Isolation of Transformation-Deficient *Streptococcus pneumoniae* Mutants Defective in Control of Competence, Using Insertion-Duplication Mutagenesis with the Erythromycin Resistance Determinant of pAM Beta 1. *J. Bacteriol.* 159: 870–876.
- Muñoz-Dorado, J., Inouye, S., Inouye, M. (1991): A Gene Encoding a Protein Serine/Threonine Kinase is Required for Normal Development of *M. xanthus*, a Gram-Negative Bacterium. *Cell* 67: 995–1006.
- Mura, A., Fadda, D., Perez, A.J., Danforth, M.L., Musu, D., Rico, A.I., Krupka, M., Denapaite, D., Tsui, H.-C.T., Winkler, M.E., Branny, P., Vicente, M., Margolin, W., Massidda, O. (2017): Roles of the Essential Protein FtsA in Cell Growth and Division in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* 199: e00608-16.
- Murray, H., Errington, J. (2008): Dynamic Control of the DNA Replication Initiation Protein DnaA by Soj/ParA. *Cell* 135: 74–84.
- Noirclerc-Savoye, M., Le Gouëllec, A., Morlot, C., Dideberg, O., Vernet, T., Zapun, A. (2005): *In Vitro* Reconstitution of a Trimeric Complex of DivIB, DivIC and FtsL, and their Transient Co-Localization at the Division Site in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* 55: 413–424.

- Nováková, L., Bezoušková, S., Pompach, P., Špidlová, P., Sasková, L., Weiser, J., Branny, P. (2010): Identification of Multiple Substrates of the StkP Ser/Thr Protein Kinase in *Streptococcus pneumoniae*. J. Bacteriol. 192: 3629–3638.
- Nováková, L., Sasková, L., Pallová, P., Janeček, J., Novotná, J., Ulrych, A., Echenique, J., Trombe, M.-C., Branny, P. (2005): Characterization of a Eukaryotic Type Serine/Threonine Protein Kinase and Protein Phosphatase of *Streptococcus pneumoniae* and Identification of Kinase Substrates. FEBS J. 272: 1243–1254.
- Ochs, M.M., Williams, K., Sheung, A., Lheritier, P., Visan, L., Rouleau, N., Proust, E., Montfort, A. de, Tang, M., Mari, K., Hopfer, R., Gallichan, S., Brookes, R.H. (2016): A Bivalent Pneumococcal Histidine Triad Protein D-Choline-Binding Protein A Vaccine Elicits Functional Antibodies that Passively Protect Mice from *Streptococcus pneumoniae* Challenge. Hum. Vaccines Immunother. 12: 2946–2952.
- Pallová, P., Hercík, K., Sasková, L., Nováková, L., Branny, P. (2007): A Eukaryotic-Type Serine/Threonine Protein Kinase StkP of *Streptococcus pneumoniae* Acts as a Dimer *In Vivo*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 355: 526–530.
- Peck, S.C. (2006): Analysis of Protein Phosphorylation: Methods and Strategies for Studying Kinases and Substrates. Plant J. 45: 512–522.
- Peck-Miller, K.A., Altman, S. (1991): Kinetics of the Processing of the Precursor to 4.5 S RNA, a Naturally Occurring Substrate for RNase P from *Escherichia coli*. J. Mol. Biol. 221: 1–5.
- Pérez, J., Castañeda-García, A., Jenke-Kodama, H., Müller, R., Muñoz-Dorado, J. (2008): Eukaryotic-Like Protein Kinases in the Prokaryotes and the Myxobacterial Kinome. Proc. Natl. Acad. Sci. 105: 15950–15955.
- Peterson, S.N., Sung, C.K., Cline, R., Desai, B.V., Snesrud, E.C., Luo, P., Walling, J., Li, H., Mintz, M., Tsegaye, G., Burr, P.C., Do, Y., Ahn, S., Gilbert, J., Fleischmann, R.D., Morrison, D.A. (2004): Identification of Competence Pheromone Responsive Genes in *Streptococcus pneumoniae* by Use of DNA microarrays. Mol. Microbiol. 51: 1051–1070.
- Pichoff, S., Lutkenhaus, J. (2005): Tethering the Z Ring to the Membrane through a Conserved Membrane Targeting Sequence in FtsA. Mol. Microbiol. 55: 1722–1734.
- Pichoff, S., Lutkenhaus, J. (2002): Unique and Overlapping Roles for ZipA and FtsA in Septal Ring Assembly in *Escherichia coli*. EMBO J. 21: 685–693.
- Raaphorst, R. van, Kjos, M., Veening, J.-W. (2017): Chromosome Segregation Drives Division Site Selection in *Streptococcus pneumoniae*. Proc. Natl. Acad. Sci. 114 (29): E5959–68.
- Ren, B., Li, J., Genschmer, K., Hollingshead, S.K., Briles, D.E. (2012): The Absence of PspA or Presence of Antibody to PspA Facilitates the Complement-Dependent Phagocytosis of Pneumococci *In Vitro*. Clin. Vaccine Immunol. 19: 1574–1582.

- Robertson, H.D., Altman, S., Smith, J.D. (1972): Purification and Properties of a Specific *Escherichia coli* Ribonuclease which Cleaves a Tyrosine Transfer Ribonucleic Acid Precursor. *J. Biol. Chem.* 247: 5243–5251.
- Rosenow, C., Ryan, P., Weiser, J.N., Johnson, S., Fontan, P., Ortqvist, A., Masure, H.R. (1997): Contribution of Novel Choline-Binding Proteins to Adherence, Colonization and Immunogenicity of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* 25: 819–829.
- Rued, B.E., Zheng, J.J., Mura, A., Tsui, H.-C.T., Boersma, M.J., Mazny, J.L., Corona, F., Perez, A.J., Fadda, D., Doubravová, L., Buriánková, K., Branny, P., Massidda, O., Winkler, M.E. (2017): Suppression and Synthetic-Lethal Genetic Relationships of Δ gpsB Mutations Indicate that GpsB Mediates Protein Phosphorylation and Penicillin-Binding Protein Interactions in *Streptococcus pneumoniae* D39. *Mol. Microbiol.* 103: 931–957.
- Samuelson, J.C., Chen, M., Jiang, F., Möller, I., Wiedmann, M., Kuhn, A., Phillips, G.J., Dalbey, R.E. (2000): YidC Mediates Membrane Protein Insertion in Bacteria. *Nature* 406: 637–641.
- Sasková, L., Nováková, L., Basler, M., Branny, P. (2007): Eukaryotic-Type Serine/Threonine Protein Kinase StkP Is a Global Regulator of Gene Expression in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* 189: 4168–4179.
- Scotti, P.A., Urbanus, M.L., Brunner, J., Gier, J.-W.L. de, Heijne, G. von, Does, C. van der, Driessen, A.J.M., Oudega, B., Luirink, J. (2000): YidC, the *Escherichia coli* Homologue of Mitochondrial Oxa1p, Is a Component of the Sec Translocase. *EMBO J.* 19: 542–549.
- Severin, A., Schuster, C., Hakenbeck, R., Tomasz, A. (1992): Altered Murein Composition in a DD-carboxypeptidase Mutant of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* 174: 5152–5155.
- Sham, L.-T., Barendt, S.M., Kopecky, K.E., Winkler, M.E. (2011): Essential PcsB Putative Peptidoglycan Hydrolase Interacts with the Essential FtsXSpn Cell Division Protein in *Streptococcus pneumoniae* D39. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108: E1061–E1069.
- Schmid, P., Selak, S., Keller, M., Luhan, B., Magyarics, Z., Seidel, S., Schlick, P., Reinisch, C., Lingnau, K., Nagy, E., Grubeck-Loebenstien, B. (2011): Th17/Th1 Biased Immunity to the Pneumococcal Proteins PcsB, StkP and PsaA in Adults of Different Age. *Vaccine* 29: 3982–3989.
- Schmidt, K.L., Peterson, N.D., Kustusch, R.J., Wissel, M.C., Graham, B., Phillips, G.J., Weiss, D.S. (2004): A Predicted ABC Transporter, FtsEX, is Needed for Cell Division in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 186: 785–793.
- Siomi, H., Matunis, M.J., Michael, W.M., Dreyfuss, G. (1993): The pre-mRNA Binding K Protein Contains a Novel Evolutionarily Conserved Motif. *Nucleic Acids Res.* 21: 1193–1198.

- Smith, R.F., King, K.Y. (1995): Identification of a Eukaryotic-Like Protein Kinase Gene in Archaeobacteria. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* 4: 126–129.
- Sung, C.K., Li, H., Claverys, J.P., Morrison, D.A. (2001): An rpsL Cassette, Janus, for Gene Replacement through Negative Selection in *Streptococcus pneumoniae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 5190–5196.
- Takyar, S., Hickerson, R.P., Noller, H.F. (2005): mRNA Helicase Activity of the Ribosome. *Cell* 120: 49–58.
- Thanbichler, M., Shapiro, L. (2006): MipZ, a Spatial Regulator Coordinating Chromosome Segregation with Cell Division in *Caulobacter*. *Cell* 126: 147–162.
- Treuner-Lange, A., Aguiluz, K., van der Does, C., Gómez-Santos, N., Harms, A., Schumacher, D., Lenz, P., Hoppert, M., Kahnt, J., Muñoz-Dorado, J., Søgaard-Andersen, L. (2013): PomZ, a ParA-Like Protein, Regulates Z-ring Formation and Cell Division in *Myxococcus xanthus*. *Mol. Microbiol.* 87: 235–253.
- Tsui, H.-C.T., Zheng, J.J., Magallon, A.N., Ryan, J.D., Yunck, R., Rued, B.E., Bernhardt, T.G., Winkler, M.E. (2016): Suppression of a Deletion Mutation in the Gene Encoding Essential PBP2b Reveals a New Lytic Transglycosylase Involved in Peripheral Peptidoglycan Synthesis in *Streptococcus pneumoniae* D39. *Mol. Microbiol.* 100: 1039–1065.
- Ulijasz, A.T., Andes, D.R., Glasner, J.D., Weisblum, B. (2004): Regulation of Iron Transport in *Streptococcus pneumoniae* by RitR, an Orphan Response Regulator. *J. Bacteriol.* 186: 8123–8136.
- Ulijasz, A.T., Falk, S.P., Weisblum, B. (2009): Phosphorylation of the RitR DNA-Binding Domain by a Ser–Thr Phosphokinase: Implications for Global Gene Regulation in the Streptococci. *Mol. Microbiol.* 71: 382–390.
- Ulrych, A., Holečková, N., Goldová, J., Doubravová, L., Benada, O., Kofroňová, O., Halada, P., Branny, P. (2016): Characterization of Pneumococcal Ser/Thr Protein Phosphatase phpP Mutant and Identification of a Novel PhpP Substrate, Putative RNA Binding Protein Jag. *BMC Microbiol.* 16: 247.
- Urlaub, H., Kruft, V., Bischof, O., Müller, E.C., Wittmann-Liebold, B. (1995): Protein-rRNA Binding Features and Their Structural and Functional Implications in Ribosomes as Determined by Cross-Linking Studies. *EMBO J.* 14: 4578–4588.
- Veening, J.-W., Hamoen, L.W., Kuipers, O.P. (2005): Phosphatases Modulate the Bistable Sporulation Gene Expression Pattern in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 56: 1481–1494.
- WHO, 2013. Introduction of Pneumococcal Vaccine PCV13, A Handbook for District and Health Facility Staff.

- Willemse, J., Borst, J.W., Waal, E. de, Bisseling, T., Wezel, G.P. van (2011): Positive Control of Cell Division: FtsZ Is Recruited by SsgB During Sporulation of *Streptomyces*. *Genes Dev.* 25: 89–99.
- Yadav, M.K., Go, Y.Y., Chae, S.-W., Song, J.-J. (2015): The Small Molecule DAM Inhibitor, Pyrimidinedione, Disrupts *Streptococcus pneumoniae* Biofilm Growth *In Vitro*. *PLoS ONE* 10: e0139238
- Yeats, C., Finn, R.D., Bateman, A. (2002): The PASTA Domain: a β -Lactam-Binding Domain. *Trends Biochem. Sci.* 27: 438–440.
- Zapun, A., Vernet, T., Pinho, M.G. (2008): The Different Shapes of Cocci. *FEMS Microbiol. Rev.* 32: 345–360.
- Zhang, L., Murphy, P.J., Kerr, A., Tate, M.E. (1993): *Agrobacterium* Conjugation and Gene Regulation by N-Acyl-L-Homoserine Lactones. *Nature* 362: 446–448.
- Zhou, Y., Mah, T.-F., Greenblatt, J., Friedman, D.I. (2002): Evidence that the KH RNA-Binding Domains Influence the Action of the *E. coli* NusA Protein. *J. Mol. Biol.* 318: 1175–1188.